

# Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone

PETER HEISIG | BERND WIEDEMANN

Antibiotika erlauben eine kausale Therapie bakterieller Infektionskrankheiten durch Wechselwirkung mit bakteriellen Zielstrukturen. Oft ist es nicht alleine diese Wechselwirkung und eine damit verbundene Hemmung einer bakteriellen Zielstruktur, die zum reversiblen Wachstumsstopp (bakteriostatische Wirkung) oder gar zur – irreversiblen – Abtötung von Bakterienzellen (bakterizide Wirkung) führt. Vielmehr werden als Folge der Wechselwirkung mit der Zielstruktur sekundäre Mechanismen ausgelöst, die den zellulär sichtbaren Effekt induzieren.

Resistenzen gegen ein Antibiotikum können durch eine einzelne Mutation oder langsam in mehreren Schritten eintreten. Dadurch können sich einzelne Bakterienzellen einer Population dem Angriff des Antibiotikums entziehen. Die Resistenzentwicklung und -ausbreitung ist in ihrer Auswirkung und Häufigkeit nicht vorhersehbar und durch mehrere bakterielle Faktoren bedingt:

- die hohe Vermehrungsgeschwindigkeit vieler Erreger, wodurch innerhalb kurzer Zeit große Zellzahlen erreicht werden können – bei einer durchschnittlichen Mutationsfrequenz von  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$ /Nukleotid ist für ein Gen von ca. 1.000 Nukleotiden Länge die statistische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von resistenten Mutanten somit ausreichend groß, um in einer typischen Kolonie mit ca.  $10^9$  Zellen mindestens eine Mutante zu finden,
- das haploide Chromosom bei Bakterienzellen (Abb. 1), wodurch eine Resistenzmutation sofort phänotypisch ausprägt werden kann sowie
- sehr effiziente Mechanismen der Übertragung genetischen Materials, vor allem über extrachromosomale Elemente mittels parasexueller Prozesse wie Transduktion, Konjugation oder Transformation (Abb. 2) von einer Zelle auf eine andere der gleichen oder auch einer anderen Spezies.

Kennt man die zugrunde liegenden Wirkungs- und Resistenzmechanismen, sollte es möglich sein, neue Antibiotika zu entwickeln, die sich durch bessere pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften sowie durch eine hohe Therapiesicherheit auszeichnen. Die Therapiesicherheit kann dadurch gewährleistet werden, dass Antibiotika eine hohe selektive Toxizität für die bakteriellen Zielstrukturen aufweisen, und zwar entweder deshalb, weil diese ausschließlich in Bakterien vorkommen – wie die Enzyme der bakteriellen Zellwandsynthese – oder sich die bakteriellen Strukturen deutlich von analogen Strukturen des Wirtsorganismus unterscheiden, wie z.B. die bakteriellen 70S-Ribosomen von den humanen 80S-Ribosomen.

## Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Chinolone

Mit Nalidixinsäure wurde 1962 der erste Vertreter der heute als Chinolone bezeichneten Substanzgruppe in die Therapie eingeführt. Erste Daten über den Wirkungsmechanismus

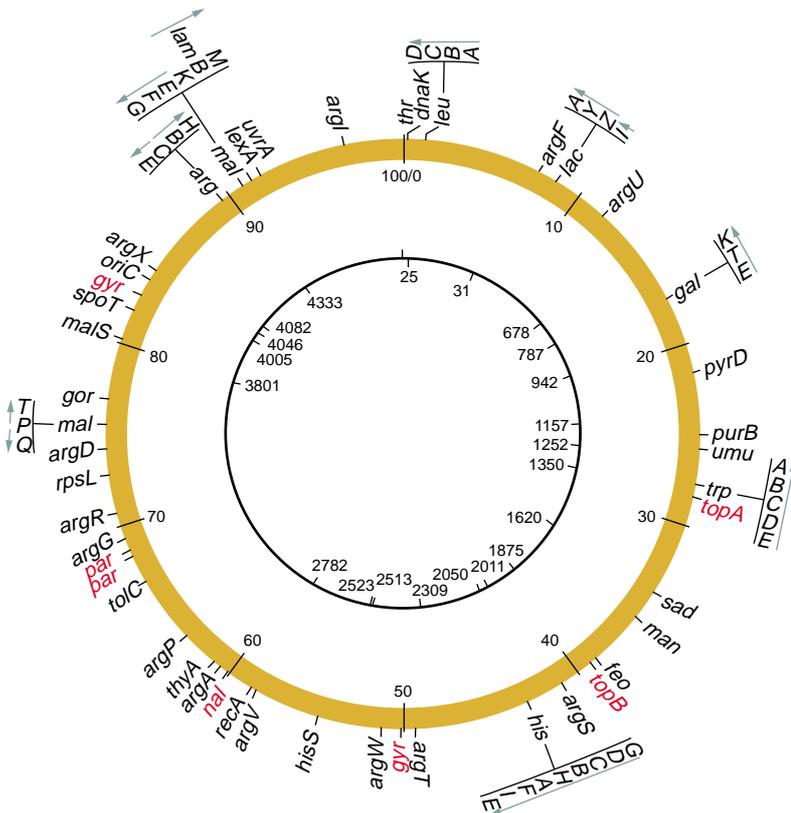


ABB. 1 Karte des E.-coli-K12-Chromosoms. Die Zahlen am äußeren Kreis geben die Minutenangaben wieder, wenn das gesamte Chromosom von 4.639.221 Bp mit 100 Minuten gleichgesetzt wird. Der innere Kreis repräsentiert die Gesamtlänge in Basenpaaren. Am äußeren Kreis sind einige Genorte sowie zum Teil deren Transkriptionsrichtung markiert. Die Gene für die Topoisomerasen (topA = TopoI, gyrA und gyrB = TopoII, topB = TopoIII, parC und parE = TopoIV) sind rot hervorgehoben.

mus oder mögliche Resistenzmechanismen zeigten, dass Nalidixinsäure die Zahl der sich aktiv teilenden Zellen von *Escherichia coli* konzentrationsabhängig reduziert, also einen bakteriziden Effekt zeigt. Dabei wird weder die Protein- noch die RNA-Synthese, sondern spezifisch die DNA-Synthese gehemmt [1]. Chinolone binden nicht an reine DNA und werden auch nicht von *E.-coli*-Zellen metabolisch verändert [2].

An der Hemmung der DNA-Synthese durch Chinolone ist mindestens das unveränderte (Wildtyp-) Produkt des *nalA*-Gens (ist *gyrA* an Pos. 50,3 min. der *E.-coli*-Standardgenkarte, Abb. 1) beteiligt [3, 4]. Werden Chinolonempfindliche *E.-coli*-Zellen auf Nalidixinsäure-haltigem Nährboden ausplattiert, kann man spontane Chinolon-resistente *nalA*-Mutanten isolieren. Diese Mutanten zeichnen sich durch eine deutlich verringerte Empfindlichkeit gegenüber allen Chinolonen aus (vollständige Kreuzresistenz) [5].

Daneben lassen sich auch Mutanten mit einer Veränderung in einem als *nalB* bezeichneten Locus (bei 60,2 min.) isolieren [3, 4]. In weitergehenden Untersuchungen mit *nalB*-Mutanten wurde gezeigt, dass deren Resistenz für unterschiedliche Chinolone variiert (partielle Kreuzresistenz) und noch etwa zehnfach unter der von *nalA*-Mutanten liegt [3]. Nach Behandlung von Zellen mit EDTA kommt es zur Chelatisierung membranstabilisierender  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen, wodurch die Integrität der äußeren Membran und damit deren Barrierefunktion beeinträchtigt wird. Bei *nalB*-Mutanten lässt sich die DNA-Synthese nach EDTA-Behandlung bereits bei deutlich niedrigeren Chinolon-Konzentrationen hemmen, was darauf hindeutet, dass bei *nalB*-Mutanten der Transport der Chinolone durch die Zellmembranen verändert ist [2].

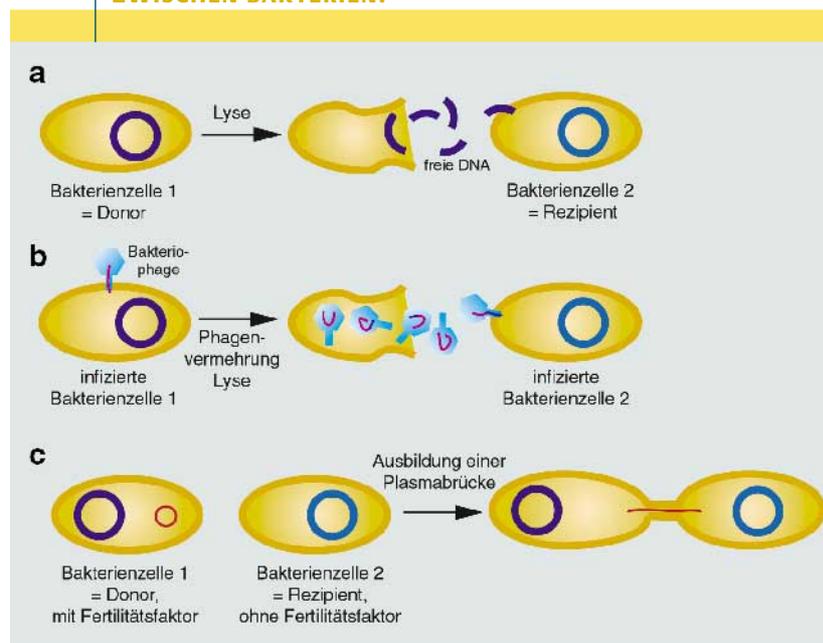
Erste genetische Untersuchungen ergaben, dass bei *nalA*-Mutanten die Resistenzeigenschaft reduziert ist, wenn eine zweite Kopie des unveränderten, d.h. Chinolonempfindlichen *nalA*-Gens in die Zellen eingeführt wird. Das bedeutet, dass das Chinolonempfindliche *nalA*-Allel dominant über das Chinolon-resistente ist [3].

### Molekulare Wirkungsweise der Chinolone

Mitte der siebziger Jahre isolierten die Arbeitsgruppen von Gellert und Cozzarelli aus *E.-coli*-Zellen ein Protein mit einer neuartigen enzymatischen Aktivität: Die DNA-Gyrase [6–8]. Gyrase aus „normalen“ *E.-coli*-Zellen ließ sich bei niedrigen Chinolon-Konzentrationen hemmen. Wurde das Enzym jedoch aus *nalA*-Mutanten isoliert, so war eine deutlich höhere Chinolon-Konzentration zur Hemmung erforderlich. Neben dem *nalA*-Genlocus wurde ein zweiter Genlocus – *cou* – identifiziert, in dem Mutationen lokalisiert wurden, die die Gyraseaktivität beeinträchtigten. *Cou* ist das Akronym für *cou*marine resistance, also eine Resistenz gegenüber Coumarin-Antibiotika, wie Novobiocin oder Coumermycin. Nach neueren Kartierungen des *E.-coli*-Chromosoms liegen diese Genloci bei 50,3 min. und bei 83,5 min. und werden als *gyrA* (vormals *nalA*) und *gyrB* (vormals *cou*) bezeichnet [4]. Die Gene codieren für die beiden

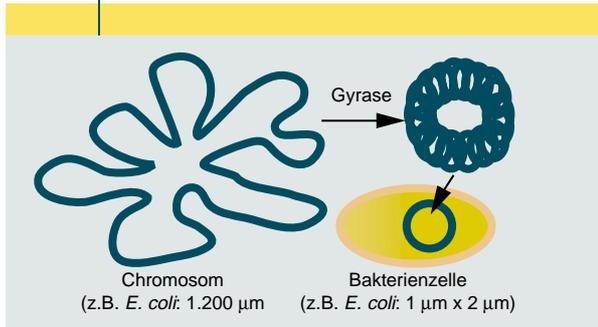
Untereinheiten A (97 kDa) und B (90 kDa) der Gyrase, die als  $A_2$ - und  $B_2$ -Dimere das tetramere Holoenzym bilden. Gyrase ist als eubakterielle Typ-II-Topoisomerase zusammen mit ihrem funktionellen Gegenspieler, Topoisomerase I [9], an der Kontrolle der Topologie, d.h. der räumlichen Anordnung der beiden ringförmig geschlossenen, miteinander verwobenen DNA-Stränge des bakteriellen Chromosoms beteiligt. Dieses weist in ausgestreckter Form eine ca. 1.000fach größere Länge als eine Bakterienzelle auf und muss daher in eine kompakte Form überführt werden, um in der Bakterienzelle (Länge etwa 1  $\mu\text{m}$ ) Platz zu finden (Abb. 3). Gleichzeitig muss DNA aber in Prozessen wie Replikation, Transkription oder Rekombination für die daran beteiligten Enzymkomplexe sowie für lokale Strangtrennungsvorgänge zugänglich bleiben. Gyrase katalysiert dabei unter Verbrauch von Energie in Form von ATP eine stärkere Entdrillung (negative Überspiralisierung) der beiden umeinander gewundenen Stränge, indem vorübergehend DNA-Doppelstrangbrüche eingeführt und die entstehenden freien 5'-Phosphatenden der DNA kovalent über einen Tyrosinrest (Aminosäure 122 entsprechend der Nummerierung des *E.-coli*-Proteins) an die A-Untereinheit des Enzyms gebunden werden (Abb. 4). Topoisomerase I entfernt (re-

ABB. 2 | VERSCHIEDENE WEGE DES HORIZONTAL GENTRANSFERS ZWISCHEN BAKTERIEN.



- a) Transformation:** Nach Lyse eines Donor-Bakteriums kann die freigesetzte DNA von einem zweiten Bakterium (Rezipient) aufgenommen werden.
- b) Transduktion:** Bakterien-spezifische Viren (Bakteriophagen) bringen eine infizierte Bakterienzelle dazu, neue Phagenpartikel herzustellen. In die Partikel kann zum Teil bakterielle DNA mit verpackt werden. Nach Lyse der Bakterienzelle 1 können die freigesetzten Bakteriophagen neue Bakterien infizieren. Dadurch kann DNA des Bakteriums 1 in Bakterium 2 gelangen.
- c) Konjugation:** Ein Bakterium mit einem Fertilitätsfaktor ( $F^+$ ) kann eine Plasmabrücke zu einem anderen Bakterium ( $F^-$ ) aufbauen, über die DNA (z.B. Plasmid-DNA) übertragen wird.

**ABB. 3 | VERDRILLUNG DER BAKTERIELLEN DNA**



**Der Größe einer Bakterienzelle (z.B. *E. coli* mit 1 µm x 2 µm Größe) steht eine Chromosomenlänge von 1.200 µm gegenüber. Nur wenn die Gyrase das bakterielle Chromosom entsprechend überdrillt, passt das große Molekül in die kleine Bakterienzelle.**

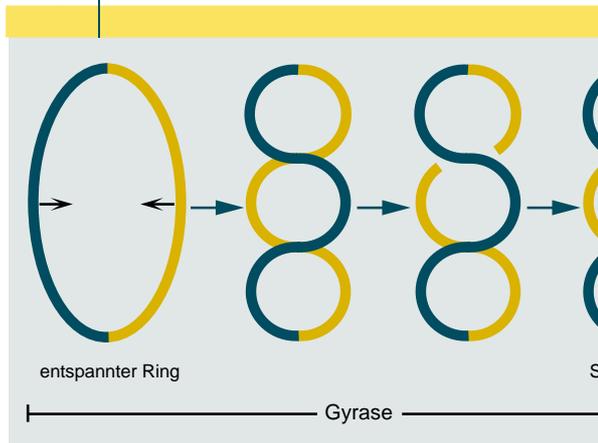
laxiert) einen Teil der Überspiralisierung ohne Energie zu verbrauchen, aber unter Einführung eines DNA-Einzelstrangbruchs (Abb. 5) [10–15]. Kleine, basische, histonähnliche DNA-Bindeproteine erhalten dabei einen Teil der Überspiralisierung aufrecht, wobei das Chromosom unter der Beteiligung solcher histonähnlichen Proteine in mehrere Schleifen (*loops*) unterteilt wird. So kann, z.B. während des Ablaufs von Replikations-, Transkriptions-, oder Rekombinationsvorgängen, der Überspiralisierungsgrad für diese Schleifen individuell verändert werden [16, 17]. Die in der DNA-Struktur gespeicherte Energie dient außerdem als Antrieb für den Ablauf der Polymerisationsvorgänge (DNA-Synthese, RNA-Synthese) entlang des Moleküls [12, 18–20].

Veränderungen im Grad der Überspiralisierung beeinflussen die Transkription verschiedener Gene. So ist die Expression der Gene *gyrA* und *gyrB* höher, wenn die DNA relaxiert ist, die des Gens *topA* dagegen höher, wenn die DNA stärker überspiralisiert ist. Dies gewährleistet eine homöostatische Kontrolle des Überspiralisierungsgrades in

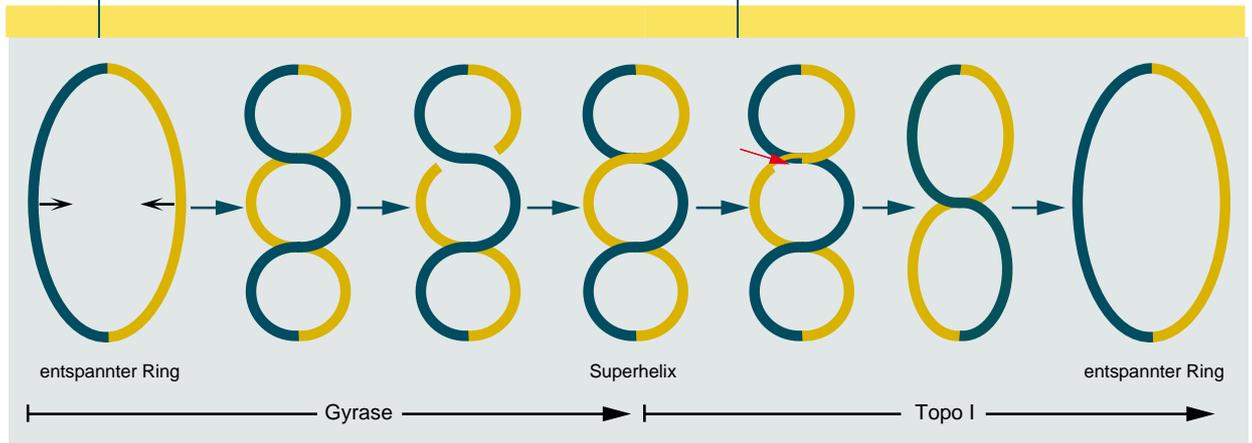
der Zelle. Vorgänge wie Replikation oder Transkription von Genen beeinflussen ihrerseits vorübergehend den lokalen Überspiralisierungsgrad [22–25].

Wenn auch der genaue Mechanismus der Überspiralisierungsreaktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so gibt es für die Gyrase von *E. coli* ein allgemein akzeptiertes Modell [26], das sich auf eine Reihe biochemischer und genetischer Untersuchungen stützt [27–30] und durch Ergebnisse neuerer Studien [31, 32] sowie einer kürzlich veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse für ein homologes Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt wird (Abb. 6) [33]. Anhand dieses Modells lässt sich auch die Chinolon-Wirkung erklären. Zunächst wird ein ca. 128 Basenpaare (Bp) großes DNA-Segment in einer Schlaufe um das tetramere Enzym gewickelt [30], das nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine herzförmige Struktur aufweist [34]. Innerhalb dieses gebundenen Segments (G, Abb. 6) erfolgt bei *E.-coli*-Gyrase, ein um 4 Bp versetzter Schnitt im DNA-Doppelstrang. Die dabei frei werdenden 5'-Phosphatgruppen werden vorübergehend über eine Phosphodiesterbindung jeweils an den Tyrosinrest (Tyr-122) jeder A-Untereinheit kovalent gebunden [35], während die freien 3'-OH-Gruppen der gegenüberliegenden Strang-Enden vermutlich über nicht-kovalente Bindungen an dem Enzym fixiert werden. Der nachfolgende Transport eines zweiten gebundenen DNA-Fragments (T, Abb. 6) durch die Bruchstelle im G-Segment könnte durch Kanäle in der Proteinstruktur erleichtert werden, wie sie aufgrund von Röntgenstrukturanalysen für ein Dimer aus N-terminalen Fragmenten der B-Untereinheit gefunden wurden. Nach dem Transport des T-Segmentes wird der Strangbruch im G-Segment wieder geschlossen, wobei die in der Tyrosin-Phosphodiesterbindung konservierte Energie verbraucht wird. Topologisch betrachtet hat sich in einem Reaktionszyklus die Anzahl der Verknüpfungen beider Stränge miteinander um 2 verringert (negative Überspiralisierung). Die dafür er-

**ABB. 4 | WIRKUNG DER GYRASE**



**ABB. 5 | WIRKUNG DER TOPOISOMERASE I**



**Die Gyrase führt energieabhängig vorübergehend einen DNA-Doppelstrangbruch ein, zieht das DNA-Molekül durch die Lücke und schließt den Strangbruch anschließend wieder.**

**Die Topoisomerase I entfernt (relaxiert) einen Teil der Überspiralisierung ohne Energie zu verbrauchen, indem sie kurzfristig einen DNA-Einzelstrangbruch setzt (roter Pfeil).**

forderliche Energie stammt aus der Hydrolyse von zwei Molekülen ATP pro Reaktionszyklus.

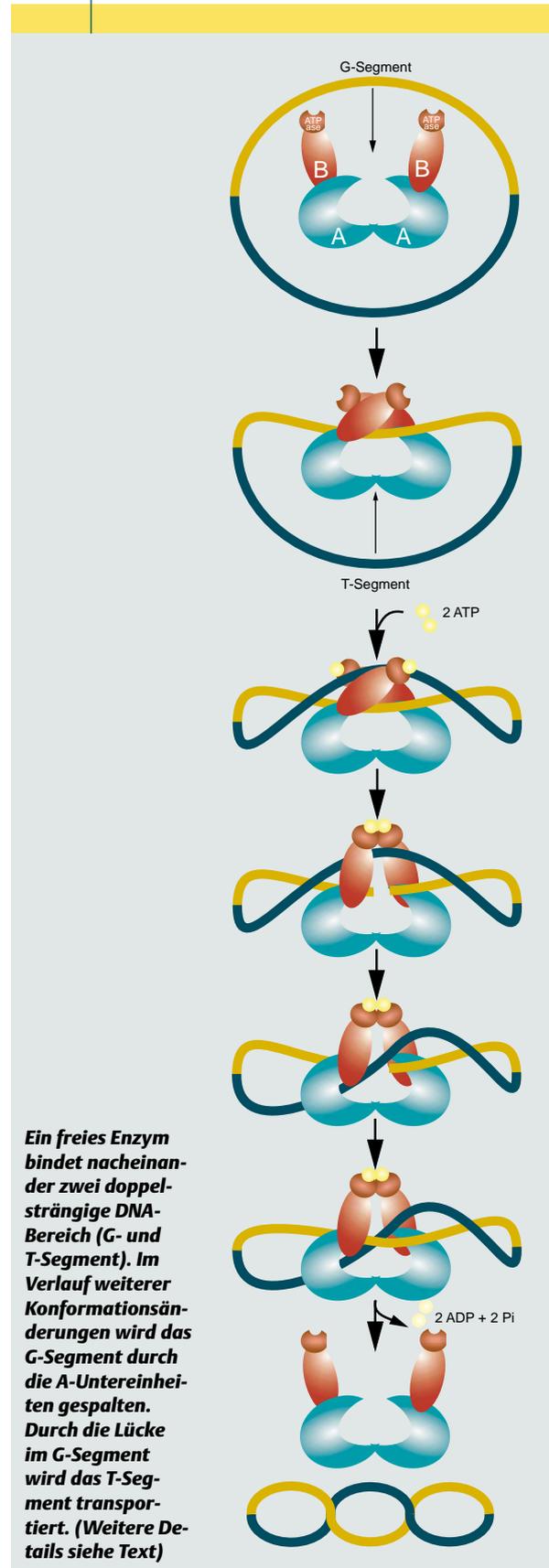
Die ATP-Moleküle binden jeweils an eine Domäne im N-terminalen Bereich der B-Untereinheiten, die charakterisiert ist durch zwei Lysinreste (Lys-103 und Lys-110) [37–44].

Nach Trypsinbehandlung der isolierten Gyrase-Untereinheiten entstehen einzelne Fragmente, denen sich bestimmte Funktionen zuordnen lassen (Abb. 7): So entstehen aus der A-Untereinheit neben einem kurzen Oligopeptid (7-Aminosäuren) zwei Fragmente mit funktionellen Bereichen. Das N-terminale Fragment (64 kDa) bis Aminosäure 571 enthält mit Tyrosin-122 das aktive Zentrum für die DNA-Spaltungs- und Verknüpfungsaktivität. Der Bereich zwischen den Aminosäuren 67 und 106 markiert die *quinolone resistance-determining region* (QRDR) zusammen mit der bei Chinolon-resistenten Erregern am häufigsten mutierten Aminosäure Serin-83 (Nummerierung der *E.-coli*-Gyrase). Darüber hinaus bindet dieses Fragment einen bakteriellen Gyraseinhibitor, das plasmidcodierte Protein CcdB. Das C-terminale Fragment (33 kDa, von Aminosäure 571 bis zum Ende an Aminosäure 875) ist beteiligt an der unspezifischen DNA-Bindung, dem *wrapping* eines 128 bp langen DNA-Bereiches (G-Segment) und stabilisiert den Komplex durch Wechselwirkung mit dem C-Terminus der B-Untereinheit.

Die B-Untereinheit wird in zwei nahezu gleich große Fragmente gespalten: Im N-terminalen Fragment (43 kDa) ist die ATPase-Aktivität lokalisiert und damit auch die Bindungsstelle für Coumarin-Antibiotika [26], wobei Mutationen an Arginin-136 zur Coumarin-Resistenz führen. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung dieser Aminosäure für die Interaktion mit dem Liganden, die aufgrund röntgenstrukturanalytischer Daten postuliert wird. Im C-terminalen Fragment (47 kDa, von Aminosäure 394 bis zum Ende an Aminosäure 804), das an der Wechselwirkung mit der A-Untereinheit beteiligt ist, befindet sich ebenfalls eine QRDR, die nach neueren Daten durch die Region zwischen den Aminosäuren 426 und 464 definiert wird, da Chinolon-Resistenzmutationen an Asp-426, Lys-447 und Ser-464 beschrieben wurden. Außerdem enthält es im C-Terminus eine Bindungsstelle für einen weiteren, natürlicherweise in bestimmten *E.-coli*-Stämmen produzierten Gyrase-Inhibitor, das Peptid Microcin B17. Die Bindungsstelle wird anhand der Lokalisation einer Microcin-B17-Resistenzmutation an Aminosäure 751 definiert. Ein weiterer, natürlich vorkommender Gyrase-Inhibitor, Cyclothialidin, interagiert ebenfalls mit der B-Untereinheit, jedoch liegen keine genauen Daten zur Bindungsstelle vor.

In den ersten Reaktionsschritten scheint allein die Bindung von ATP die Konformationsänderungen des Enzyms zu bewirken. Allerdings kann erst durch die ATP-Hydrolyse das Enzym am Ende des Reaktionszyklus wieder in die Ausgangskonformation gebracht werden. Für die Reaktion ist außerdem die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen notwendig. Sowohl die ATP-Hydrolyse durch die B-Untereinheit, als auch die endonukleolytische Aktivität der A-Untereinheit

ABB. 6 REAKTIONSMCHANISMUS DER TYP-II-TOPOISOMERASE



werden im Holoenzym erst nach DNA-Bindung aktiviert [45, 46].

Der genaue Angriffsort der Chinolone ist zwar noch nicht identifiziert, doch liegt eine Reihe experimenteller Daten dazu vor: Nach *In-vitro*-Untersuchungen ist die Bindung von Chinolonen an reine DNA schwach und unspezifisch, an Gyrase allein nicht nachweisbar, aber an den Enzym-DNA-Komplex spezifisch und in Konzentrationen sättigbar, die auch für die Hemmung der Überspiralisierungsreaktion notwendig sind [47, 48]. Die unspezifische Bindung von Chinolon-Molekülen an reine DNA erfordert  $Mg^{2+}$ -Ionen [49, 50]. Auch der ternäre Komplex aus Enzym, DNA und Chinolon wird durch  $Mg^{2+}$ -Ionen stabilisiert [51]. Dieser Komplex ist zumindest *in vitro* für über 3 Std. stabil [52]. Setzt man diesem ternären Komplex ein Tensid (Natriumlaurylsulfat = SDS) zu, so wird das kovalent gebundene Enzym denaturiert. Nach proteolytischer Behandlung wird lineare DNA freigesetzt [7, 8]. Den gleichen Effekt zeigen  $Ca^{2+}$ -Ionen [28]. In Anwesenheit von Chinolonen wird die gleiche DNA-Sequenz gespalten wie in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen mit unterschiedlichen DNA-Molekülen wurde eine Konsensus-Erkennungs- und Spaltsequenz abgeleitet, die sich u.a. auch in Plasmiden sowie im Chromosom des Bakteriophagen Mu findet [45, 53–58]. Die Sequenz ist in Abb. 8 dargestellt.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell entwickelt, nach dem die 4-Oxo-3-carboxylgruppierung der Chinolone über Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminogruppen der ungepaarten Nukleotide an der durch die Gyrase erzeugten Spaltstelle interagiert. An dieser Bindung sind mehrere Chinolon-Moleküle beteiligt, die über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der aromatischen Ringsysteme einerseits und über hydrophobe Wechselwirkungen der N-1-Substituenten andererseits miteinander interagieren und damit in kooperativer Weise an den Enzym-DNA-Komplex binden [59, 60].

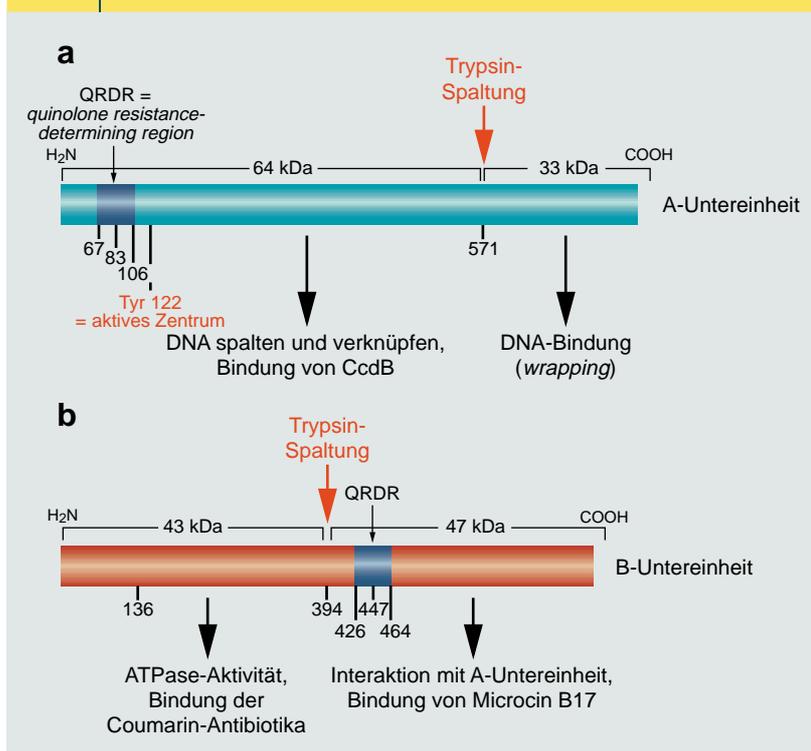
Gegen dieses Modell sprechen jedoch einige experimentelle Befunde, so dass die Autoren dieses Artikels ebenso wie Maxwell und Mitarbeiter von einer direkten Wechselwirkung der DNA-gebundenen Gyrase mit Chinolonen ausgehen.

- Eine Einzelmutation in der Gyrase A-Untereinheit (z.B. an Serin-83 oder Aspartat-87, Nummerierung entsprechend der Gyrase A-Untereinheit von *E. coli*) bewirkt eine Verringerung der Affinität von Chinolonen zum Gyrase-DNA-Komplex [52, 61].
- Chinolone binden auch an Gyrase-DNA-Komplexe, in denen die DNA nicht gespalten vorliegt und somit keine Interaktion mit ungepaarten Nukleotiden eingehen kann [30].
- Nach *Molecular-Modeling*-Studien, die eine strukturelle Homologie zwischen Gyrase und der einzigen bislang röntgenstrukturanalytisch charakterisierten Typ-II-Topoisomerase (TopoII) aus *S. cerevisiae* annehmen, befinden sich die für die Chinolon-Resistenz besonders wichtigen Aminosäuren Ser83 und Asp87 auf der gleichen Seite einer der Außenseite zugewandten  $\alpha$ -Helix, entsprechend der  $\alpha$ 4-Helix von TopoII, und sind damit in enger räumlicher Nähe zu Trp122 im aktiven Zentrum. In Übereinstimmung mit Daten zu natürlich vorkommenden Mutanten (Ser83-Leu und Asp87-Gly) [61], wurde an hochgereinigten Gyrase-Enzymen, bei denen gezielt Serin-83 und/oder Aspartat-87 durch Alanin ersetzt worden war, eine deutlich höhere Resistenz gegenüber Chinolonen gefunden als bei Enzymen mit einer Einzelmutation. Weitere Daten deuten auf eine Interaktion zwischen Substituenten an der C8-Position des Chinolon-Grundkörpers mit einem  $\alpha$ -N-Atom einer Peptidbindung zwischen Aminosäure 83 und 87 hin [62].

### Auswirkungen der Gyrasehemmung durch Chinolone

Chinolone fixieren den Gyrase-DNA-Komplex in einem Reaktionszwischenstadium, in dem das Enzym kovalent mit der DNA verbunden ist. Dadurch kommen Polymerisationsreaktionen entlang der DNA, wie die DNA-Replikation und die Transkription, rasch zum Erliegen. Es werden rasch „Stress-Reaktionen“ ausgelöst, wie die SOS-Antwort oder die Hitzeschockantwort [69–71]. Die Aufgabe der SOS-Reaktion ist die Notreparatur von DNA-Schäden, wie sie z.B. auch infolge von UV-Bestrahlung hervorgerufen werden.

**ABB. 7 | DOMÄNENSTRUKTUR DER E.-COLI-GYRASE-UNTEREINHEITEN**



**Nach Trypsinbehandlung der isolierten Gyrase-Untereinheiten lassen sich den entstandenen Fragmenten einzelne Funktionen zuordnen. Weitere Details siehe Text.**

ABB. 8 | KONSENSUS-SPALTSEQUENZ DER GYRASE



R = Purinbase  
 Y = Pyrimidinbase  
 N = jedes Nukleotid möglich  
 [ ] = seltener vorhandenes Nukleotid

Der Pfeil markiert dabei die Spaltstelle. An Pos. 13 der Sequenz findet sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit entweder ein T oder ein G [26].

Dabei wird die Zellteilung vorübergehend angehalten, um Zeit für eine - fehlerbehaftete - SOS-Reparatur zu lassen. Chinolone bewirken eine dauerhafte Induktion der SOS-Antwort, die jedoch zu einem Zusammenbruch der Membranintegrität [63] und schließlich zum Zelltod führt [64-68].

Die Bedeutung solcher Stress-Antwortsysteme für die bakterizide Chinolonwirkung wird daran ersichtlich, dass die Hemmung der Proteinsynthese durch z.B. Chloramphenicol, den bakteriziden Effekt einiger, vor allem älterer Chinolone stark abgeschwächt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass in Anwesenheit von Ciprofloxacin dieser antagonistische Effekt von Chloramphenicol nicht beobachtet wird und *in vitro* bereits ohne Zusatz von Detergentien (SDS) freie DNA-Enden nachweisbar sind. Daraus wird geschlossen, dass Ciprofloxacin die DNA-Enden durch Destabilisierung des Gyrase-Tetramers freisetzt und dadurch eine bakterizide Wirkung zeigt [72]. Die verschiedenen Chinolone können demnach auf unterschiedliche Weise bakterielle Zellen abtöten.

Chinolone hemmen nicht nur die Synthese chromosomaler DNA, sondern auch die von Plasmiden, bestimmten Bakteriophagen sowie Rekombinationsreaktionen, wodurch es zu weiteren Effekten wie Elimination von Plasmiden [73, 74], Hemmung der replikativen Transposition des Bakteriophagen Mu oder Hemmung der Transformation von natürlich kompetenten Zellen von *N. gonorrhoeae* kommt [75].

### Bakterielle Resistenz gegen Chinolone

Unter Resistenz versteht man die relative Unempfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika.

Betrachtet man eine Vielzahl von Bakterienstämmen einer Species, so lassen sich zwei Arten von Antibiotika-Resistenzen unterscheiden: Natürliche (primäre) Resistenz, die alle Stämme einer Bakterien-species betrifft, und erworbene (sekundäre) Resistenz, die nur einzelne Stämme einer Species aufweisen. So sind z.B. alle Stämme von *Enterococcus faecium* gegen Chinolone primär resistent, während *E.-coli*-Stämme primär empfindlich sind, nur einzelne weisen eine erworbene Resistenz auf.

Eine sekundäre Resistenz kann prinzipiell auf drei Grundmechanismen beruhen: Einer Veränderung der Ziel-

struktur, einer Verringerung der Antibiotikumkonzentration am Wirkort oder einer Inaktivierung des Antibiotikums.

Bislang waren bei *E. coli* nur zwei Mechanismen einer erworbenen Chinolon-Resistenz nachgewiesen worden: Die mit *gyrA/gyrB*-Mutationen einhergehenden Veränderungen der Zielstruktur, die eine gewisse klinische Relevanz zeigen, sowie die mit verringerter Chinolon-Akkumulation in den Zellen einhergehende *nalB*-Mutation (s.o., Tab. 1). Es ist jedoch nicht gelungen, Ein-Schritt-Mutanten von *E. coli* zu selektieren, die eine klinische Resistenz gegen Chinolone aufweisen [82-88]. Auch konnte bei Bakterien kein Inaktivierungs-Mechanismus für Chinolone nachgewiesen werden - lediglich Holzfüulepilze scheinen dazu in der Lage zu sein (siehe S. 450). Die *gyrA*- bzw. *gyrB*-vermittelte Resistenz ließ sich auch nicht übertragen, was auf das oben genannte Dominanzphänomen zurückgeführt werden kann. Lediglich in einem einzigen Bericht wird über einen Resistenztransfer berichtet, wobei dadurch alleine jedoch keine klinisch relevante Resistenz erreicht wurde [76].

Diese Befunde sowie die deutlich höhere Aktivität der Fluorchinolone im Vergleich zu den älteren, nicht-fluorierten Vertretern haben zu einer allzu optimistischen Einschätzung der Risiken für eine mögliche klinische Resistenzentwicklung geführt.

Dennoch hat sich in wenigen Jahren nach Einführung der Fluorchinolone auch bei natürlicherweise empfindlichen Species wie *E. coli* eine deutliche Resistenzentwicklung gezeigt. Dies betrifft sowohl die Prävalenz der Fluorchinolon-Resistenz (1990: < 0,2 %; 1998: ca. 8 % in Deutschland [77]), als auch die Höhe der Resistenz (bei einzelnen resistenten Isolaten wurden minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von Ciprofloxacin mit 64 µg/mL und höher bestimmt (bei empfindlichen Isolaten liegen die MHK-Werte bei 0,015 µg/mL).

### BESTIMMUNG DER EMPFINDLICHKEIT GEGEN ANTIBIOTIKA

Für die quantitative Bestimmung von Resistenz werden zwei Methoden angewandt: Bei der Reihenverdünnung wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Dabei wird durch serielle 1:2-Verdünnung eine Konzentrationsreihe eines Antibiotikums hergestellt. Den einzelnen Konzentrationen wird dann eine definierte Zahl an Bakterienzellen, das sogenannte Inokulum, in Nährbouillon zugesetzt. Die geringste Konzentration, die nach Bebrütung sichtbares Bakterienwachstum (Trübung der Nährbouillon) hemmt, ist die MHK.

Bei der Hemmhofmethode werden auf einen Agarnährboden, auf den das Inokulum aufgetragen wurde, runde Filterplättchen aufgelegt, die eine definierte Menge an Antibiotikum enthalten. Aus diesen diffundiert während der Bebrütung das Antibiotikum in die Umgebung und bildet dort einen Konzentrationsgradienten aus. Je nach Empfindlichkeit wachsen die Zellen des Inokulums bis auf einen bestimmte Abstand an das Testplättchen heran, es bildet sich ein sogenannter Hemmhof aus. Der Durchmesser des Hemmhofes ist umgekehrt proportional zur Hemmkonzentration.

Für die therapeutische Anwendung von Antibiotika ist die Relation der MHK zu Konzentrationen des Antibiotikums, z.B. am Infektionsort oder im Serum wichtig (klinisch resistent oder empfindlich).

**TAB. 1 | EIGENSCHAFTEN CHINOLON-RESISTENTER EIN-SCHRITT-MUTANTEN VON *E. COLI***

Mutation <sup>a)</sup>	Position	Genotyp	Phänotyp	MHK Nal	MHK Cip
–	–	WT	WT	4	0,02
<i>gyrA</i>	50,3	Ala67	Resistenz gegen alle Chin.	32	0,08
<i>gyrA</i>	50,3	Cys81	Resistenz gegen alle Chin.	64	0,16
<i>gyrA</i>	50,3	Asp81	Resistenz gegen alle Chin.	4	0,16
<i>gyrA</i>	50,3	Leu83	Resistenz gegen alle Chin.	512	0,64
<i>gyrA</i>	50,3	Trp83	Resistenz gegen alle Chin.	512	0,64
<i>gyrA</i>	50,3	Ala83	Resistenz gegen alle Chin.	80	0,2
<i>gyrA</i>	50,3	Pro84	Resistenz gegen alle Chin.	32	0,16
<i>gyrA</i>	50,3	Asn87	Resistenz gegen alle Chin.	256	0,32
<i>gyrA</i>	50,3	His106	Resistenz gegen alle Chin.	16	0,08
<i>gyrA</i>	50,3	Arg106	Resistenz gegen alle Chin.	10	0,2
<i>gyrB/nalD</i>	83,5	Asn426	Resistenz gegen alle Chin.	64	0,16
<i>gyrB/nalC</i>	83,5	Glu447	Keine Resistenz gegen 7-Piperazinylchinolone	64	0,005
<i>ompF</i>	21,2		OmpF <sup>-</sup> , OmpC <sup>+</sup>	8	0,04
<i>ompC</i>	49,7		OmpF <sup>+</sup> , OmpC <sup>-</sup>	4	0,02
<i>marR</i>	34,8	Leu77	OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Cip-Akk. ↓	8	0,16
<i>marR/cfxB</i>	34,8	Δ285 Bp	OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Cip-Akk. ↓	16	0,08
<i>marR/soxQ</i>	34,8	Thr70	OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Cip-Akk. ↓	8	n.d.
<i>nalB</i>	60,2		+EDTA, Nal-Diff. ↑	8	n.d.
<i>nalD</i>	88,8		bei 30°C Nal <sup>S</sup> , Nal-Diff. ↓	16	n.d.
<i>nfxB</i>	19		OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Cip-Akk. ↓	16	0,04
<i>norB</i>	34		OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>R</sup> , Cip-Akk. ↓	16	0,08
<i>norC</i>	8		OmpF <sup>-</sup> , Clm <sup>S</sup> , Cip-Akk. ↓; LPS <sup>(-)</sup>	1	0,04

a) Die Daten wurden zusammengestellt nach [2, 3, 108, 109, 147].

b) Die Angaben entsprechen der revidierten Genkarte von *E. coli* K-12 [4].

Resistenz<sup>(R)</sup> oder Sensitivität<sup>(S)</sup> gegen Chloramphenicol (Clm), Tetracyclin (Tet) oder Nalidixinsäure (Nal) angegeben als minimale Hemmkonzentration (MHK) ebenso wie Erhöhung (↑) oder Erniedrigung (↓) der Ciprofloxacin-Akkumulation (Cip-Akk.) oder der Diffusion von Nalidixinsäure (Nal-Diff.) sind angegeben.

### Resistenzmechanismus durch Veränderungen der Zielstruktur

Die Identifizierung von Gyrase-assoziierten Resistenzmutationen war nach der Veröffentlichung der vollständigen DNA-Sequenz des *gyrA*-Gens aus einem chinolonempfindlichen Stamm von *E. coli* K12 möglich. Das *gyrA*-Gen ist 2625 Bp lang und codiert für ein Protein mit 875 Aminosäuren mit einem berechneten M<sub>r</sub> von 96.887 Da [78].

Alle mit unfluorierten Chinolonen selektierten Einzelmutanten [79, 80] betreffen eines der Codons Ala67, Gly81, Ser83, Ala84, Asp87 oder Gln106. Dieser Bereich von Ala67 bis Gln106 wurde daher als Chinolon-Resistenz-determinierende Region (*quinolone resistance-determining region*, QRDR) bezeichnet. Den stärksten MHK-Anstieg zeigte eine Mutation an Ser83 zu Leu oder zu Trp, einen nur geringfügig schwächeren eine Mutation an Asp87 zu Asn. Die isolierten Gyrase-Enzyme weisen eine reduzierte Affinität für Chinolone auf [52, 81]. Die MHK-Werte der getesteten Fluorchinolone Ciprofloxacin, Enoxacin, Norfloxacin und Ofloxacin lagen aber für diese Mutanten noch unterhalb der im Serum oder Gewebe erzielbaren Wirkstoffkonzentrationen (klinische Empfindlichkeit trotz sekundär erworbener biologischer Resistenz) (Tab. 1) [79, 80].

Bei solchen Versuchen wurde – mit Ausnahme der Mutanten *nalC* und *nalD*, die eine partielle Kreuzresistenz gegenüber Chinolonen und eine schwache Novobiocin-Resistenz aufweisen [5, 89] – eine Vielzahl von Mutanten selektiert, die sich von *gyrA*-Mutanten in zwei Punkten unterscheiden: Fehlende Kreuzresistenz für alle Chinolone sowie Parallelresistenz zu anderen, nicht verwandten Antibiotika. Alle Nicht-*gyrA*-Mutationen bewirken aber einen geringeren MHK-Anstieg als die Mutationen an Ser83 im *gyrA*-Gen (Tab. 1).

Durch weitere Analysen wurden die *nalC*- und *nalD*-Mutationen als Mutationen im *gyrB*-Gen identifiziert, die zu einem Austausch der Aminosäure Asp426 zu Asn (*nalD*) bzw. Lys447 zu Glu (*nalC*) führen [90] (Tab. 1), weshalb dieser *gyrB*-Bereich in Analogie ebenfalls als Chinolon-Resistenz-determinierende Region bezeichnet wird [91]. Während die *nalD*-Mutation einen schwachen Anstieg der MHK aller getesteten Chinolone zeigt und damit einer *gyrA*-Mutation ähnelt, findet sich bei *nalC*-Mutanten lediglich ein MHK-Anstieg für solche Chinolone, die wie Nalidixinsäure (Nal) sind.

Bei solchen Versuchen wurde – mit Ausnahme der Mutanten *nalC* und *nalD*, die eine partielle Kreuzresistenz gegenüber Chinolonen und eine schwache Novobiocin-Resistenz aufweisen [5, 89] – eine Vielzahl von Mutanten selektiert, die sich von *gyrA*-Mutanten in zwei Punkten unterscheiden: Fehlende Kreuzresistenz für alle Chinolone sowie Parallelresistenz zu anderen, nicht verwandten Antibiotika. Alle Nicht-*gyrA*-Mutationen bewirken aber einen geringeren MHK-Anstieg als die Mutationen an Ser83 im *gyrA*-Gen (Tab. 1).

xinsäure oder Oxolinsäure eine negative Nettoladung aufweisen (saure Chinolone). Für die anderen Substanzen mit einem basischen Heterocyclus an Position C-7 ist die MHK gegenüber dem Ausgangsstamm KL16 (*gyrB*<sup>+</sup>) verringert. Basierend auf einem errechneten Hydrophobizitätsprofil der Gyrase-B-Untereinheit postulieren Yoshida und Mitarbeiter [91] ein Strukturmodell, wonach die Aminosäuren Asp426 und Lys447 am Eingang einer Bindungstasche für den C-7-Substituenten liegen: In dieser „Wildtypsituation“ neutralisieren sich die Ladungen und haben wahrscheinlich kaum einen Abstoßungseffekt auf einen neutralen (Alkylrest) oder einen basischen (Piperazinrest) Substituenten. Bei *nalD*-Mutanten führt der Verlust der negativen Ladung (Asp426 zu Asn) zu einer erhöhten Abstoßung beider C-7-Substituenten; die MHK aller Chinolone steigt. Bei *nalC*-Mutanten dagegen ist der Abstoßungseffekt zweier negativer Ladungen (Asp426 und Glu447 anstelle von Lys) auf einen Alkylrest größer als beim Wildtyp, während ein basischer Piperazinrest sogar besser binden kann; die MHK-Werte solcher Chinolone verringern sich. Der bei beiden *gyrB*-Mutanten beobachtete, leichte MHK-Anstieg von Novobiocin kann nur mit weitreichenden Konformationsänderungen des Proteins erklärt werden, da sich die ATP-Bindungsstelle im N-terminalen Bereich um Aminosäure 110 befindet [37].

### Resistenz durch verringerte Akkumulation am Wirkort

Die äußere Membran stellt bei gram-negativen Bakterien die eigentliche Penetrationsbarriere für geladene Moleküle, wie Chinolone dar. Der Aufbau der äußeren Membran ist komplex (Abb. 9a) [92]: Auf einer inneren Phospholipid-Schicht liegen Lipid-A-Bereiche des Lipopolysaccharids auf. Daran schließen sich Polysaccharidketten mit stark konservierter Kernregion und variablen, sogenannten O-spezifischen Seitenketten an. Kleine wassergefüllte Transmembrankanäle, sogenannte Porine, gebildet aus drei Proteinen, stellen für hydrophile Moleküle den wichtigsten Zugang zum Zellinneren dar. Bei *E. coli* kommt dem Porin OmpF (*outer membrane protein F*) die wesentliche Bedeutung für den Eintritt von Chinolonen in die Zelle zu. Eine Reihe *in vitro* selektierter, Chinolon-resistenter Mutanten von *E. coli* - *nfxB* [93], *nfxC* [94], *cfxB* [84] und *mar(R)* [95-97], *norB* und *norC* [98] (Tab. 1) - weisen keine Veränderungen in der Gyrase auf, zeigen dafür aber Veränderungen in der Menge der OmpF-Porine und gleichzeitig eine verringerte Akkumulation von Chinolonen. Für diesen Effekt ist wahrscheinlich die verringerte OmpF-Menge nicht allein verantwortlich, da eine Mutante, bei der das *ompF*-Gen ausgeschaltet ist, mehr Norfloxacin akkumuliert und einen geringeren Anstieg der MHK zeigt als eine *mar(R)*-Mutante (Tab. 1).

Gibt man zu Wildtyp-Zellen von *E. coli* Carbonylcyanid-m-chlorphenyl-hydraton (CCCP), wird der über der bakteriellen Zytoplasmamembran anliegende Protonengradient gestört. Dies bewirkt eine erhöhte Akkumulation von Chi-

nolonen in der Zelle [95]. Der Protonengradient stellt u.a. Energie für den Export von Chinolonen über Effluxpumpen bereit, die mit einer gewissen Aktivität auch Chinolone aktiv aus der Zelle heraus transportieren [99].

Inzwischen wurden eine Reihe von sogenannten Permeabilitätsmutanten charakterisiert. Dazu gehören Mutanten, bei denen die O-Seitenketten des Lipopolysaccharids unterschiedliche Länge aufweisen. Diese zeigen nur eine verringerte Empfindlichkeit für hydrophobe Substanzen (Nalidixinsäure, Oxolinsäure, Pimomidsäure), während hydrophile Chinolone (Enoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Cinoxacin, Pipemidsäure) wirksam bleiben. Daher wird angenommen, dass hydrophobe Chinolone die Lipidschicht direkt penetrieren [100, 101]. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass einerseits die Behandlung der Zellen mit EDTA, um die Seitenketten-stabilisierenden Mg<sup>2+</sup>-Ionen zu entfernen, die Wirksamkeit dieser Substanzen erhöht [s. o.; 102-104], andererseits die Zugabe von zweiwertigen Kationen zu einem Wirkungsverlust führt [105]. Vermutlich bilden sich über die 4-Oxo-3-carbonyl-Gruppierung große Chelatkomplexe aus 2 Chinolon-Molekülen und 1 Zentralatom aus, die weder durch die Lipidschicht, noch durch die kleinen Porinkanäle dringen können [106].

Daneben gibt es eine Reihe von *in vitro* selektierten Mutanten, die eine geringfügige Nalidixinsäure-Resistenz zeigen, ohne dass der zugrundeliegende Mechanismus bekannt ist [107-109].

### Klinische Resistenz gegenüber Chinolonen

Aufgrund der hohen antibakteriellen Aktivität der Chinolone bei gleichzeitig guter Gewebepenetration und geringen Tendenz zur Resistenzentwicklung [110] wurden erste Berichte über Isolate von *E. coli* mit klinisch relevanter Chinolon-Resistenz als seltene Einzelfälle angesehen [111-114], zumal frühere epidemiologische Studien keinen signifikanten Anstieg Chinolon-resistenter Isolate von *E. coli* erkennen ließen [115, 116].

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus einer derartig hohen Chinolon-Resistenz bei klinischen Isolaten, wurde aus der Stuhlflora eines gesunden Probanden ein Chinolonempfindlicher *E.-coli*-Stamm (Wildtyp = WT, MHK Cip 0,015 µg/mL) isoliert. Um eine Mutante mit klinisch relevanter Resistenz (MHK Cip = 64 µg/mL) zu isolieren, waren drei Selektionsschritte notwendig, die schließlich zu den Mutanten MI (MHK Cip 0,5 µg/mL), MII (MHK Cip 2 µg/mL) und MIII (MHK Cip 64 µg/mL) führten. Ein

### INTERNET-LINKS:

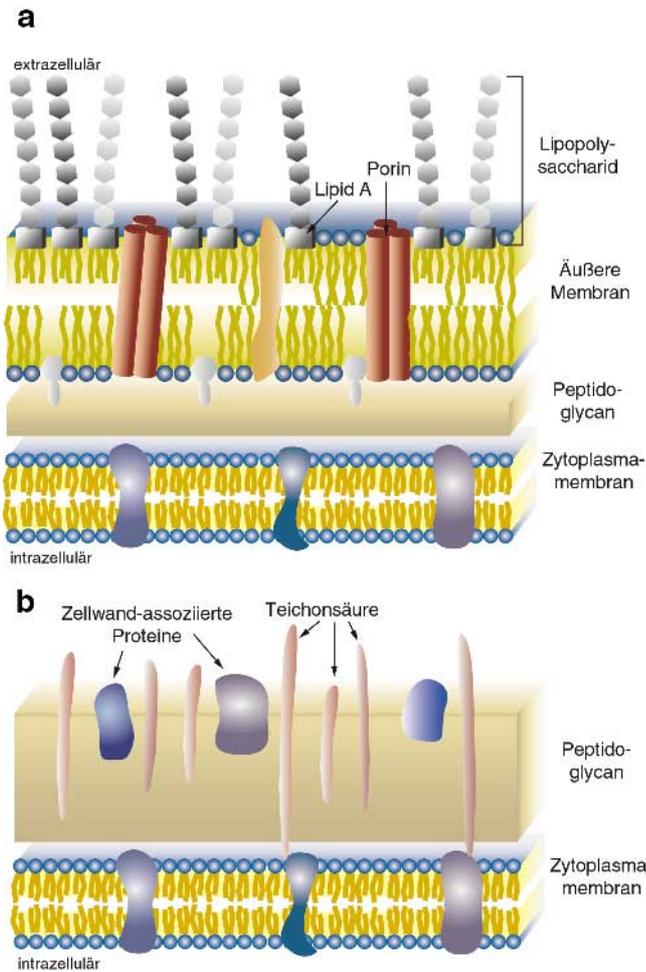
<http://www.expasy.ch>  
allgemeine Protein-Datenbank

<http://bmb.med.miami.edu/EcoGene/EcoWeb/index.html>  
spezielle *E.-coli*-Gendatenbank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/framk?db=Genome&gi=115>  
komplettes *E.-coli*-Genom des National Center for Biotechnology Information der National Institutes of Health

### ZUR NOMENKLATUR:

DNA-Abschnitte, die für ein bestimmtes Protein codieren, werden mit dem klein und kursiv geschriebenen Protein-Kürzel bezeichnet (z.B. *ompF*-Gen). Das entsprechende Protein wird dagegen mit Großbuchstaben abgekürzt (z.B. OmpF).



**ABB. 9 Aufbau der Zellwand bei Eubakterien**  
**Gram-negative Bakterien haben eine relativ dünne Peptidoglycan-Schicht. Zusätzlich ist eine äußere Membran vorhanden, die über spezielle Kanalproteine, die Porene verfügt.**  
**Gram-positive Bakterien haben eine sehr dicke Peptidoglycanschicht, aus der Teichonsäure-Reste herausragen.**

genetischer Dominanztest zeigte für die Mutanten MI und MIII, dass Mutationen in der A-Untereinheit, nicht aber der B-Untereinheit der Gyrase beteiligt sind. Bei Mutante MII war im Vergleich zum Ausgangsstamm WT die Chinolon-Akkumulation um ca. 70 % verringert und gleichzeitig die Resistenz für Nicht-Chinolon-Antibiotika erhöht.

Die DNA-Sequenzanalyse der QRDR von *gyrA* ergab insgesamt zwei Mutationen: Serin83 zu Leucin (Ser83Leu) bei MI und zusätzlich Aspartat87 zu Glycin (Asp87Gly) bei MIII. Übereinstimmend wurde die Überspiralisierungsaktivität der aus MI isolierten Gyrase erst bei 10-fach höherer Ciprofloxacin-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp gehemmt, während die Gyrase, die aus MIII isoliert worden war, nicht einmal bei über 1.500-fach höherer Konzentration hemmbar war. Diese Differenzen entsprechen etwa denen der jeweiligen MHK-Werte von Ciprofloxacin für die Mutanten [61].

Wurde dagegen lediglich der DNA-Abschnitt des *gyrA*-Gens von MIII, der die beiden Mutationen trug, durch gezielte Mutagenese gegen den entsprechenden DNA-Abschnitt im Ausgangsstamm WT ausgetauscht, so blieb das aus der resultierenden Mutante (WT-3) isolierte Enzym ebenso unempfindlich, wie das aus MIII, die Zellen selbst aber waren erheblich empfindlicher (MHK Cip 1 µg/mL, anstelle von 64 µg/mL bei MIII) (Tab. 2). Dies deutete darauf hin, dass für die Ausprägung der hohen Resistenz eine weitere Mutation bei MIII vorlag, die in Mutante WT-3 aber fehlte.

Nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Hoshino [117] stellt eine andere Typ-II-Topoisomerase, Topoisomerase IV (TopoIV) [118], eine sekundäre Zielstruktur für Chinolone dar, die *in vitro* durch Chinolone gehemmt wird. Sowohl hinsichtlich der Struktur als auch auf der Ebene der Aminosäuresequenzen bestehen große Ähnlichkeiten zwischen Gyrase und Topoisomerase IV. So bildet TopoIV eine tetramere Struktur aus zwei Paaren von Untereinheiten ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub>, für die die Gene *parC* bzw. *parE* codieren. Die Proteine weisen besonders im Bereich der QRDRs hohe Homologien zu GyrA (ParC) und GyrB (ParE) auf [119]. TopoIV hat die Aufgabe, die replizierten Tochterchromosomen, die vor der Zellteilung wie Glieder einer Kette miteinander verwoben sind, zu binden. Anschließend führt sie einen für Typ-II-Topoisomerasen charakteristischen versetzten Doppelstrangbruch ein und trennt die DNA-Moleküle voneinander (Decatenierung, Abb. 10). Aus topologischer Sicht wird dabei überspiralisierte DNA in einer ATP-abhängigen Reaktion relaxiert. Chinolone hemmen diese Decatenierungsaktivität *in vitro*, wobei die Hemmkonzentrationen für TopoIV von *E. coli* 3- bis 50-fach höher liegen als für Gyrase [119-120]. Diese Daten sowie der Nachweis von Mutationen in den Genen für Topoisomerase IV bei Chinolon-resistenten Stämmen von *Neisseria gonorrhoeae* [121], einer anderen Gram-negativen Species mit natürlicherweise hoher Chinolon-Empfindlichkeit und *S. aureus* [122], deuteten darauf hin, dass auch bei *E. coli* die Topoisomerase IV an der Ausprägung einer hohen Chinolon-Resistenz beteiligt sein könnte.

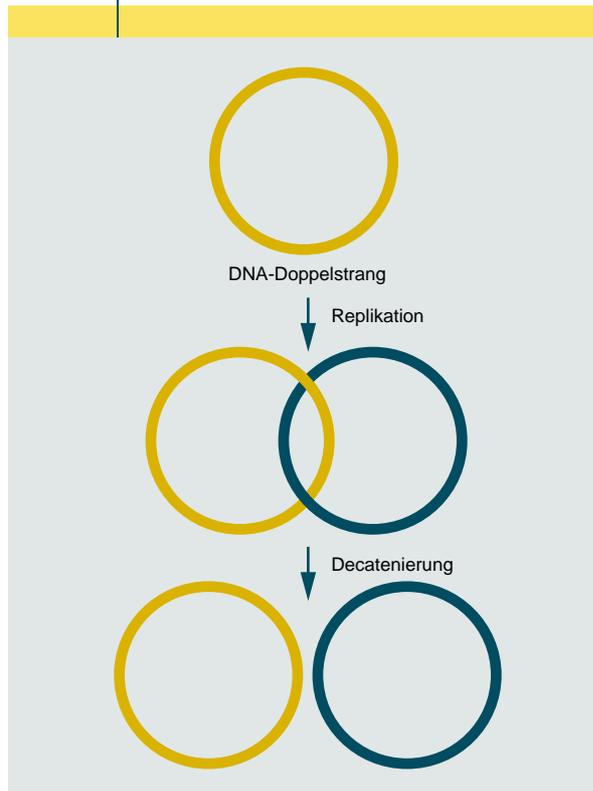
Die Ergebnisse von DNA-Sequenzanalysen des QRDR-analogen Bereichs in *parC* bestätigten die Annahme zunächst für die *in vitro* selektierten Labormutanten: Bei Mutante MIII, nicht jedoch bei WT, MI und MII war die Aminosäure Serin80 zu Isoleucin (Ser80Ile) verändert [123, 124]. Diese Mutation ist analog zu der Ser83Leu-Mutation in GyrA. Genetische Dominanztests und die biochemische Analyse isolierter TopoIV-Enzyme bestätigten, dass dieses Enzym eine sekundäre Zielstruktur für Chinolone in *E. coli* darstellt. Die DNA-Sequenzanalyse von *parC* verschiedener Chinolon-resistenter klinischer Isolate von *E. coli*, aber auch diverser anderer Erreger bestätigte die Bedeutung von TopoIV-Mutationen auch für die Entwicklung einer hohen Chinolon-Resistenz [121, 125-130]. Für viele hochresistente Isolate konnte neben der Kombination von Gyrase- und TopoIV-Mutationen auch ein *mar*-ähnlicher Phänotyp mit

geringer Parallelresistenz gegenüber z.B. Chloramphenicol und Tetracyclin sowie einer reduzierten Chinolon-Akkumulation nachgewiesen werden [125, 131]. Für Mutante MII beruht dieser *mar*-Phänotyp auf einer Deletion im *marR*-Gen, das für den Repressor des *mar*-Operons codiert [125]. Durch diese Deletion wird der Repressor dauerhaft inaktiviert und dadurch das *mar*-Operon angeschaltet, das neben *marR* auch die Gene *marB* und *marA* enthält. Letzteres codiert für den Transkriptionsaktivator MarA, der einerseits eine negative Regulation für die Expression des OmpF-Porins bewirkt. Die OmpF-Porine der äußeren Membran stellen für die relativ hydrophilen Chinolone die wichtigste Durchtrittspforte durch die lipophile Barriere dar. Durch die geringere Anzahl an Porinen ist die Chinolon-Aufnahme in die Zelle vermindert. Zusätzlich wird das Effluxpumpensystem AcrAB-TolC angeschaltet und darüber der Austransport von Chinolonen erhöht [132, 133]. Beide Systeme wirken somit synergistisch bei der Reduktion der Chinolon-Konzentration am Zielort, sind jedoch nicht Chinolon-spezifisch und bewirken im Vergleich zu Topoisomerase-Mutationen auch nur einen geringen Anstieg der MHK-Werte. In klinischen Isolaten von *E. coli* wurden *mar*-Mutationen lediglich in ca. 10 - 15 % der Fälle nachgewiesen [134]. Dies deutet darauf hin, dass neben *mar* noch andere Genloci beteiligt sein können. So sind bei *E. coli* verschiedene Effluxsysteme identifiziert worden, die u.a. auch Chinolone aus der Zelle heraus transportieren [135].

Eine besondere Rolle spielen Effluxsysteme bei der Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber vielen Antibiotika, einschließlich Chinolonen [136]. Mindestens drei verschiedene Pumpen, die wie AcrAB-TolC dem Typ RND (*resistance, nodulation, division*) angehören - MexAB-OprJ, MexCD-OprN, MexEF-OprM - sind dort als Resistenzursache vor allem bei klinischen Isolaten identifiziert worden [137-142].

Neue Chinolone wie Sparfloxacin und Moxifloxacin zeigen eine verbesserte Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Erregern, wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. Doch auch bei diesen Erregern sind hochresistente Isolate gefunden worden, denen die gleiche

ABB. 10 | DECATENIERUNG DER CHROMOSOMEN



Bei der Replikation des zirkulären Bakterienchromosoms entstehen zwei Tochterchromosomen, die wie Kettenglieder ineinander hängen. Die TopoIV trennt diese Chromosomen voneinander.

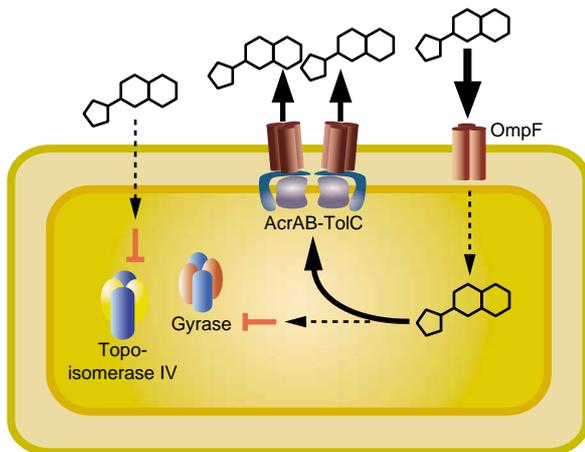
Kombination der beiden bekannten Resistenzmechanismen zugrundeliegen: *GyrA*- und *parC*-Mutationen sowie Mutationen, die zu einer Erhöhung des Effluxes von Chinolonen führen (Abb. 11). In zwei Punkten unterscheiden sich die Resistenzmechanismen bei Gram-positiven von denen bei Gram-negativen Erregern:

- Die Topoisomerase IV ist bei Gram-positiven die primäre, d.h. die empfindlichere Zielstruktur für Chinolone. Bei Gram-negativen Bakterien weist dagegen die Gyra-

TAB. 2 | HEMMWERTE IN VITRO UND IN VIVO FÜR GYRASE OHNE (WT), MIT EINER (MI, WT-3-2) ODER MIT ZWEI GYRA-MUTATIONEN (WT-3, MIII, 205096)

Stamm	<i>gyrA</i> -Mutation(en)	MHK Cip [µg/mL]	MHK Cip in <i>gyrA</i> <sup>ts</sup> Stamm [µg/mL] bei 43°C	IC <sub>90</sub> supercoiling [µg/mL]
WT	-	0,015	0,03	1
MI	S83L	0,5	0,25	10
WT-3-2	D87G	0,25	0,125	10
WT-3	S83L+D87G	1	0,5	>2.000
MIII	S83L+D87G	64	-	(>2.000) <sup>a)</sup>
205096	S83L+D87G +OmpF <sup>-</sup>	64	-	>2.000

<sup>a)</sup> Wert in Analogie zu *E. coli* 205096 (Isolat 321) übernommen, da gleiche Doppelmutation vorliegt. Daten z.T. aus [61].



**ABB. 11 Die klinische Chinolonresistenz bei *E. coli* beruht auf einer Kombination verschiedener Resistenzmechanismen (Einzelheiten siehe Text).**

se eine höhere Chinolon-Empfindlichkeit auf. In beiden Fällen sind vor allem die QRDRs in den N-terminalen Bereichen der A-Untereinheiten von den Veränderungen betroffen.

- Efflux-Systeme wie NorA bei *S. aureus* [143, 144] oder PmrA bei *S. pneumoniae* [145] gehören zum Typ *major facilitator* (MF). Diese Pumpen, die vor allem die Wirkung von hydrophilen Chinolonen wie Ciprofloxacin oder Norfloxacin abschwächen, weniger die von hydrophoben, wie Sparfloxacin oder Moxifloxacin, werden durch Reserpin gehemmt [146]. Auch bei diesen Erregern bewirkt der Mechanismus lediglich eine geringe Resistenzsteigerung, die erst in Kombination mit Mutationen in den Genen für die Zielstrukturen (Gyrase und/oder Topoisomerase IV) eine klinisch relevante Ausprägung erfährt.

### Zusammenfassung und Ausblick

Trotz hoher bakterizider Wirkung auf eine Vielzahl verschiedener Erreger finden sich zunehmend Resistenzentwicklungen. In allen Fällen sind für die Ausprägung klinisch relevanter Resistenzen Kombinationen von Resistenzmutationen erforderlich. Diese Mutationen betreffen vor allem die A-Untereinheiten der Chinolon-empfindlicheren primären (bei Gram-negativen Bakterien: Gyrase) und der weniger empfindlichen sekundären (bei Gram-negativen Bakterien: Topoisomerase IV) Zielstruktur (bei den meisten Gram-positiven ist die Hierarchie umgekehrt). Bevorzugte Stellen für Resistenzmutationen sind hochkonservierte Aminosäuren innerhalb einer Chinolon-Resistenz-determinierenden Region. Daneben ist fast immer eine verringerte Chinolon-Akkumulation – hervorgerufen durch verstärkte Expression unspezifischer Effluxpumpen – beteiligt.

Neben Strukturanalysen mittels Röntgenbeugung sind es vor allem Ergebnisse genetischer und biochemischer Analysen Chinolon-resistenter Enzyme, die darauf hindeuten, dass Chinolone nicht nur mit DNA, sondern auch mit der beteiligten Topoisomerase (Gyrase oder TopoIV) interagieren. Diese Daten bilden die Grundlage für erste Molecular-Modeling-Studien, die Hinweise auf Strukturverbesserungen liefern können, um für die Zukunft eine weitere Zunahme von Resistenzen zu verzögern – eine Verhinderung der Resistenzentwicklung ist nach bisherigen Erfahrungen in der antibakteriellen Therapie wegen der hohen genetischen Variabilität und Vermehrungsgeschwindigkeit bakterieller Erreger auf lange Sicht kaum zu erreichen.

Literatur beim Verfasser

### MECHANISMEN DER CHINOLINRESISTENZ

Zum einen ist das MarA-Protein betroffen, das einerseits die Expression des OmpF-Porins verringert und andererseits die Expression des AcrAB-TolC-System steigert. Die in der Zytoplasmamembran lokalisierte Pumpe AcrB ist durch das Membranfusionsprotein AcrA mit dem Porin TolC in der äußeren Membran verbunden ist. Durch den dadurch entstehenden Kanal werden die Chinolone aus dem Zytoplasma direkt in den Extrazellularraum gepumpt. Durch diese beiden Mechanismen wird die intrazelluläre Chinolon-Konzentration reduziert. Bei Gram-positiven Erregern ist wegen des Fehlens einer äußeren Membran nur das Effluxpumpensystem, das für den Austransport der Chinolone verantwortlich ist, an der Reduktion der intrazellulären Chinolonkonzentration beteiligt.

## EINTEILUNG DER TOPOISOMERASEN

Klassifizierung		Struktur	Wichtigste Reaktion
<b>Typ-I-Topoisomerase</b>			
Bakterien	Topoisomerase I	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
	Topoisomerase III	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
Eukaryonten	Topoisomerase I	eine Untereinheit	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA
	Topoisomerase III (Isoenzyme $\alpha$ mit 2 Isoformen und $\beta$ mit 3 Isoformen)	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
<b>Typ-II-Topoisomerase (ATP-abhängig)</b>			
Bakterien	Topoisomerase II (Gyrase)	Tetramer aus 2 GyrA- und 2 GyrB-Untereinheiten	Einführen von negativen Supercoils; Relaxation negativ superhelikaler DNA Auflösung von Catenanen und verknüpften DNA-Ringen
	Topoisomerase IV	Tetramer aus 2 ParC- und 2 ParE-Untereinheiten	Trennung der Bakterienchromosomen nach DNA-Replikation Decatenierung
Eukaryonten	Topoisomerase II (Isoenzyme $\alpha$ und $\beta$ mit 2 Isoformen)	Dimer aus identischen Untereinheiten	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA

Aus: Wang, J.C.: DNA Topoisomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 65 (1996), 635–692

## Die Autoren



Prof. Dr. Peter Heisig (geb. 1958); 1977 – 1981 Pharmaziestudium an der Freien Universität, Berlin; 1982 Approbation zum Apotheker; 1983 – 1987 Dissertation im Otto-Warburg-Laboratorium am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin bei Dr. Kahmann (Leitung Prof. Dr. T.A. Trautner); 1987 Promotion an der Universität Bonn; 1987 – 1992 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn (Leitung: Prof. Dr. B. Wiedemann); 1992 – 1997 Wissenschaftlicher Assistent (C1) an der Universität Bonn; 1997 Habilitation an der Universität Bonn; 1997 – 2000 Oberassistent (C2) an der Universität Bonn; seit September 2000 Professor (C4) am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg; seit September 2000 Vorsitzender des Ausschusses Mikrobiologie der Deutschen Arzneibuch-Kommission.



Prof. Dr. Bernd Wiedemann (geb. 1939); Studium der Naturwissenschaften, einschließlich Medizinischer Mikrobiologie und Hygiene an den Universitäten Tübingen, Karlsruhe und Kiel; 1966 Promotion an der Universität Kiel; 1967 – 1972 Wissenschaftlicher Assistent am Hygiene-Institut in Frankfurt/Main; 1972 Ernennung zum Professor; 1972 – 1973 Aufenthalt an der Medical School in Bristol, Department of Bacteriology; seit 1974 Leiter der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie an der Universität Bonn und bis 2000 Vorsitzender des Ausschusses Mikrobiologie der Deutschen Arzneibuch-Kommission.

**Anschriften:**

Peter Heisig  
Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie  
Institut für Pharmazie  
Universität Hamburg  
Bundesstrasse 45  
20146 Hamburg

Bernd Wiedemann  
Pharmazeutische Mikrobiologie  
Universität Bonn  
Meckenheimer Allee 168  
53115 Bonn