

# Das Siderophor-Antibiotikum Salmycin

Studien zu Wirkspektrum,  
Aufnahmemechanismus, Resistenzbildung  
und *in-vivo*-Wirksamkeit

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

Thomas Gwinner

aus Gaildorf

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2008



Tag der mündlichen Prüfung: 7. März 2008

Dekan: Prof. Dr. H. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter: Prof. K. Hantke



*Quod me nutruit,  
me destruit*

Meinen Eltern gewidmet



D A N K E  
Asp Ala Asn Lys Glu  
aac gcc gac aag gag

Herrn Prof. Dr. Braun für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes

Herrn Prof. Klaus Hantke für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinen KollegInnen und Freunden am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Membranphysiologie. Genannt seien insbesondere Marianne Valdebenito für ihre unersetzliche Hilfe an der HPLC und Unterstützung bei der Auswertung des Tiermodells. Klaus Eisele für zahlreiche Tipps und wertvolle Lektionen in Zellkulturtechnik, Julia Hullmann als unersetzliche Quelle für Methodentechnik nicht zu vergessen viele heitere Momente mit Steffi, Silke und Janina..

Auch die zahlreichen helfenden Hände im Hintergrund: Christina, Claudia, Yvonne, Beate und Helmut möchte ich nicht vergessen

Herrn Prof. Winkelmann danke ich für wertvolle Zusatzinformationen und Ratschläge.

Ich danke Herrn Prof. Fiedler und seinen wissenschaftlichen Mitarbeitern für ihre hilfreichen Anweisungen und Unterstützung in der Fermentation und Aufreinigung von Salmycin, sowie für die Überlassung der notwendigen Geräte und Materialien.

Herrn Prof. Götz, Bernhard Krismer und Melanie Kull gilt mein Dank für zahlreiche Ratschläge und Protokolle zum Umgang mit *S. aureus*, sowie für die Überlassung von Teststämmen aus ihrer Stammsammlung.

Herrn Dr. Bohn, Juliane Klenk und Avijit Pramanik danke ich für ihre Unterstützung bei der *in-vivo*-Studie, Herrn Dr. Kempf für die Vorbereitung und Überlassung der Patientenisolate.

Florestan, der ausserhalb des Forschungsbetriebs, wohl am meisten unter meinen Launen zu leiden hatte und trotzdem nicht davon abließ, mich zu unterstützen und aufzumuntern.

Für meine Finanzierung danke ich:

Dem Kompetenznetzwerk Baden-Württemberg zur Untersuchung von Antibiotikaresistenzen, der Landesgraduiertenförderung und der Max-Planck-Gesellschaft, sowie den Fonds der Deutschen Chemischen Industrie.



# Inhaltsverzeichnis

## A – Einleitung

A.1. Eisen und bakterielles Wachstum	1
A.2. Eisenversorgung und Virulenz	2
A.3. Die bakterielle Zellwand	3
A.4. Bakterielle Eisenaufnahmesysteme	4
A.5. Siderophore	6
A.6. Sideromycine	7
A.7. Salmycin	8
A.8. Antibiotikaresistenzen und Aussichten	9
A.9. Ziele dieser Arbeit	11

## B – Material und Methoden

### B.1. Material

B.1.1. Chemikalienliste	12
B.1.1.1. Labor-Chemikalien	12
B.1.1.2. Antibiotikazusätze	13
B.1.1.3. Eisenchelatoren	13
B.1.1.4. Siderophore und Sideromycine	13
B.1.2. Puffer und Lösungen	14
B.1.2.1. Agarosegel-Puffer	14
B.1.2.2. SDS-PAGE	14
B.1.2.3. His-Tag-Aufreinigung	15
B.1.3. Nährmedien	16
B.1.4. Medien für Radioaktivtransporte	18
B.1.5. Medien für Streptomycceten	19
B.1.6. Kits und Antikörper	20
B.1.7. Enzyme	20
B.1.8. Primer	21
B.1.9. Plasmide und Vektoren	22
B.1.10. Verwendete Laborstämme	23
B.1.11. Untersuchte Patientenisolat	24
B.1.12. Geräte und Laborhilfsmittel	25
B.1.12.1. Laborgeräte	25
B.1.12.2. Sonstige Laborgeräte	26
B.1.12.3. Verbrauchsmaterial	26
B.1.13. Hardware	27
B.1.14. Software und Datenbanken	27

### B.2. Methoden

B.2.1. Haltung von Streptomycceten	28
B.2.1.1. Kultivierung	28
B.2.1.2. Sporengewinnung	28
B.2.2. Salmycinproduktion	28
B.2.2.1. Fermentation im kleinen Maßstab	28
B.2.2.2. Fermentation im mittleren Maßstab	28
B.2.3. Säulenchromatographie	29
B.2.3.1. XAD16-Chromatografie	29
B.2.3.2. Regenerieren von XAD16-Säulenmaterial	29
B.2.3.3. Aufkonzentrieren des Rohprodukts	29
B.2.3.4. Chromatographie mit LH20-Sepharose	29

B.2.3.5. HPLC	30
B.2.3.6. Massenspektrometrie	30
B.2.3.7. Präparation von eisenfreiem Salmycin	30
B.2.4. Bestimmung der Salmycinaktivität	31
B.2.4.1. Anzucht der Teststämme	31
B.2.4.2. Plattendiffusionsassay	31
B.2.4.3. Wachstumsassay	32
B.2.4.4. Isolierung von Mutanten	32
B.2.4.5. Bouillon-Mikroverdünnungsverfahren	32
B.2.4.6. Bestimmung der Resistenzhäufigkeit	33
B.2.4.7. Bestimmung der Kreuzresistenz	34
B.2.4.8. Bestimmung der Aktivität von aufgenommenem Salmycin in <i>S. aureus</i>	34
B.2.5. Molekularbiologische Methoden	34
B.2.5.1. PCR	34
B.2.5.2. Cycle Sequencing und Sequenzierung	35
B.2.5.3. Isolierung von DNA aus Bakterien	36
B.2.5.3.1. Genomische DNA aus <i>S. aureus</i>	36
B.2.5.3.2. Plasmid-DNA (aus <i>E. coli</i> )	36
B.2.5.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren	37
B.2.5.4.1. Aufreinigung von DNA (PCR-Ansätzen)	37
B.2.5.4.2. Aufreinigung aus Agarose-Gelen	38
B.2.5.4.3. Ethanolfällung	38
B.2.5.5. Transformation	39
B.2.5.5.1. Elektroporation	39
B.2.5.5.2. Chemische Transformation	39
B.2.5.6. Klonierung	40
B.2.5.7. Nachweis von Mutationen	40
B.2.6. Transportassays mit radioaktivem <sup>55</sup> Fe	41
B.2.6.1. Herstellung der Substrate	41
B.2.6.2. Modifikationen für kompetitiven Transportassay	42
B.2.6.3. Anzucht der Teststämme	42
B.2.6.4. Transportmessung	42
B.2.7. Proteinaufreinigung	43
B.2.7.1. Überexpression von Proteinen	43
B.2.7.2. Zellaufschluss	43
B.2.7.3. His-Tag-Aufreinigung über Ni-NTA-Säulen	44
B.2.7.4. Proteinbestimmung über BCA-Assay	44
B.2.7.5. Protease-Schutzexperimente	44
B.2.7.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
B.2.8. Bestimmung der Zytotoxizität	45
B.2.8.1. Zellkultur	45
B.2.8.2. LDH-Assay	46
B.2.8.2.1. Salmycin-Zytotoxizitäts-Assay	47
B.2.9. <i>In-vivo</i> -Infektionsmodell	48
B.2.9.1. Bestimmung der Infektionsdosis	48
B.2.9.2. <i>In-vivo</i> -Wirksamkeit von Salmycin	49
B.2.10. <i>In-silico</i> -Arbeiten	50
B.2.10.1. Phylogenetische Analyse	50
B.2.10.2. Sequenzvergleiche	50
B.2.10.3. Statistische Tests	51

## C – Ergebnisse

C.1. Salmycin – Produktion und Aufreinigung	52
C.1.1. Produktionsmedium	52
C.1.1.1. pH-Wert	53
C.1.1.2. Temperatur	54
C.1.1.3. Belüftung	54
C.1.1.4. Ornithin-Supplementation	55
C.1.1.5. Eisen-Supplementation	56
C.1.2. Produktions- und Aufreinigungsverfahren	57
C.1.2.1. Fermentation im 20l-Maßstab	57
C.1.2.2. Salmycinaufreinigung über Säulenchromatographie	57
C.1.2.3. Massenspektrometrie und HPLC	59
C.1.2.4. Aufreinigungserfolg	59
C.1.2.5. Isoliertes Salmycin hydrolysiert rasch	60
C.1.2.6. Salmycin zerfällt bei Entfernung des Eisenatoms	61
C.2. Wirkspektrum	63
C.2.1. Salmycinempfindlichkeit Gram-positiver Bakterien	63
C.2.2. Aktivität gegen Actinomyceten	65
C.2.3. Aktivität gegen Enterobacteriaceae und andere Gram-negative Bakterien	66
C.2.4. Wirksamkeit gegen eukaryotische Pathogene	68
C.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	68
C.3.1. Modifikation des Mikroverdünnungsverfahrens	69
C.3.2. Bestimmung der MHK von Salmycin A bei Gram-negativen Bakterien	69
C.3.3. Die MHK von Salmycin A bei <i>Staphylococcus aureus</i>	72
C.3.4. Vergleich der Hemmwirkungen von Salmycin A und Vancomycin	75
C.4. Der antibiotische Effekt von teilhydrolysiertem Salmycin	76
C.4.1. Effekt von teilhydrolysiertem Salmycin auf Gram-negative Keime	76
C.4.2. Effekte von Mehrfachgaben von teilhydrolysiertem Salmycin auf Enterobakterien	78
C.4.3. Effekt von hydrolysiertem Salmycin auf <i>S. aureus</i>	81
C.4.4. Effekt von teilhydrolysiertem Albomycin auf <i>S. aureus</i>	83
C.4.5. Effekte von Mehrfachgaben von teilhydrolysiertem Sideromycin auf <i>S. aureus</i>	84
C.5. Resistenzbildung	85
C.5.1. Resistenzentwicklung bei <i>Hafnia</i> , <i>Enterobacter</i> und <i>Klebsiella</i>	85
C.5.1.1. Überlebensrate unter Salmycineinfluss	85
C.5.1.2. Resistenzraten bei <i>Hafnia</i> , <i>Enterobacter</i> und <i>Klebsiella</i>	88
C.5.2. Resistenzentwicklung bei <i>Staphylococcus aureus</i>	92
C.5.2.1. Überlebensrate von <i>S. aureus</i> unter Einfluss von Salmycin	92
C.5.2.2. Resistenzraten von <i>S. aureus</i>	93
C.6. Hydroxamat-Aufnahmesysteme als Salmycin-Transporter	93
C.6.1. Salmycin-Aufnahme bei <i>Bacillus subtilis</i>	93
C.6.2. Salmycin-Aufnahme bei <i>S. aureus</i> : das FhuCBG-Operon	98
C.6.3. Untersuchungen zur aufnahmebedingten Resistenzbildung bei <i>S. aureus</i>	99
C.6.3.1. Mutationsdetektion mit dem Surveyor-Kit	100
C.6.3.2. Mutationen im Membrankomplex	100

C.6.3.3. Mutationen im Bindeprotein	103
C.6.4. Salmycin A und Salmycin B führen zu identischer Resistenzbildung	104
C.6.5. Salmycin wird intracellulär inaktiviert	104
C.7. Aufnahme von Salmycin bei Gram-negativen Bakterien	105
C.7.1. Klonierung von <i>foxA<sub>Yers.</sub></i>	105
C.7.2. Komplementation von <i>E. coli</i> mit dem äusseren Membrantransporter <i>foxA<sub>Yers.</sub></i>	106
C.7.3. <i>tatC</i> ist notwendig für die Salmycinaufnahme	107
C.7.4. Komplementation von <i>K. pneumoniae</i>	109
C.8. Salmycin-Sensitivität und Hydroxamataufnahme im phylogenetischen Zusammenhang	111
C.9. Untersuchung der Bindeproteine von <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> und <i>B. subtilis</i>	113
C.9.1. Sequenzvergleich der Bindeproteine	113
C.9.2. Klonierung von <i>FhuD2<sub>S.aureus</sub></i>	113
C.9.3. Überexpression von pTG6	114
C.9.4. Überexpression von pMR20	115
C.9.5. Proteinbestimmung im BCA-Assay	116
C.9.6. Bindungsassay mit aufgereinigten Proteinen	117
C.10. Zytotoxizität	118
C.10.1. Einfluss auf BSA auf die Bioaktivität	118
C.10.2. Konzentrationsabhängige Zytotoxizität	119
C.10.3. Zeitkinetik	122
C.11. <i>In-vivo</i> -Wirksamkeit von Salmycin	123
C.11.1. Dosisfindung	124
C.11.2. Modifikation der Positivkontrolle	125
C.11.3. Salmycin B besitzt <i>in vivo</i> keine antibiotische Wirkung	127
C.11.4. <i>In-vivo</i> -Resistenzbildung	127
<b>D – Diskussion</b>	<b>128</b>
D.1. Salmycinaufreinigung	129
D.2. Intrinsische Eigenschaften von Salmycin und ihre Effekte	130
D.3. Wirkspektrum und minimale Hemmkonzentration	132
D.4. Aufnahmesysteme	134
D.5. Gram-negative Keime und Resistenz	137
D.6. Resistenzbildung	138
D.6. Effekte auf Eukaryoten und <i>in-vivo</i> -Anwendung: Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	140
D.7. <i>In-vivo</i> -Aktivität	141
D.8. Wirkungsweise von Salmycin	143
D.9. Sideromycine- eine effektive Waffe gegen Superkeime	144
<b>E – Zusammenfassung</b>	<b>146</b>
<b>F – Index</b>	<b>148</b>
<b>G – Literatur</b>	<b>151</b>
<b>H – Lebenslauf</b>	<b>168</b>

# A. Einleitung

## A.1. Eisen und bakterielles Wachstum

Eisen stellt für nahezu alle Bakterien ein existenziell wichtiges Spurenelement dar, denn es ist hauptverantwortlich für die Aktivität vieler Schlüsselenzyme. Bei der Zellatmung spielt es eine entscheidende Rolle in den membranassoziierten Cytochrom-Oxidasen der Elektronentransportkette, wo es in Hämverbindungen und Eisen-Schwefel-Clustern den Ablauf vitaler Redox-Reaktionen katalysiert. Ebenso ist der bakterielle Zellstoffwechsel abhängig von eisenhaltigen Metalloenzymen, wie etwa der Aconitase im Krebs-Zyklus oder der für die DNA-Synthese verantwortlichen Ribonukleotid-Reduktase (Justino et al., 2007; Velayudhan et al., 2007). Die Stickstofffixierung der Cyanobakterien ist nur bei Vorhandensein von Eisen möglich, denn es ist ein unverzichtbarer Bestandteil des Reaktionszentrums der Nitrogenase (Howard und Rees, 2006; Hu et al., 2006). Zahlreiche Katalasen und Peroxidasen im bakteriellen Cytosol tragen Eisen im Redoxzentrum oder benötigen es als Cofaktor (Braun, 2001).

Nur sehr wenige Mikroorganismen, wie *Borrelia burgdorferi* oder einige Spezies aus der Gruppe der Lactobacilli, sind in der Lage, gänzlich oder weitestgehend auf die Aufnahme von Eisen zu verzichten (Archibald and Duong, 1983; Posey und Gherardini, 2000). Lactobazillen gelingt es beispielsweise, Eisen durch alternative Cofaktoren zu ersetzen oder Häm als Fremdkomplexverbindung in ihren Stoffwechsel zu integrieren. *B. burgdorferi* dagegen weist keinerlei eisenabhängige Genregulation auf, wie sie normalerweise bei Bakterien anzutreffen ist (Katona et al., 2004). Tatsächlich ist Eisen mit 4,7% Anteil eines der häufigsten Elemente der Erdkruste und nach Aluminium das zweithäufigste Metall (Atkins, 1996). Trotzdem ist es für Bakterien unter aeroben Bedingungen nahezu nicht verfügbar, da es zumeist in  $\text{Fe}^{3+}$ -Form vorliegt und im neutralen und alkalischen pH-Bereich nahezu unlösliche Aqua-Komplexe ( $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ) bildet. In der natürlichen Umgebung beträgt die Konzentration an freiem Eisen lediglich rund  $10^{-9}$  M, wobei Bakterienwachstum eine Verfügbarkeit von mindestens  $10^{-7}$  M Eisen(III) voraussetzt (Ratledge & Dover 2000, Braun & Hantke, 2007).

Noch problematischer stellt sich die Situation für bakterielle Pathogene dar. Die Konzentration an freiem Eisen in menschlichem Serum liegt im Bereich von lediglich  $10^{-24}$  M (Braun, 2005). Etwa 78 % des gesamten Eisens liegt gebunden in Form von Häm und Hämoglobin vor. Ein kleinerer Anteil wird im Serum durch Transferrin und Lactoferrin gebunden. Weitere 15 % werden intrazellulär durch Ferritin komplexiert gespeichert (Braun, 2001; Carlyon et al., 2005). Die Aufrechterhaltung eines extrazellulären Eisenmangels dient höheren Lebewesen – neben der Verhinderung von Radikalbildung – somit auch als Schutzmechanismus vor Infektionen.

### A.2. Eisenversorgung und Virulenz

Aufgrund des Eisenmangelzustands haben Mikroorganismen ein breites Spektrum an Strategien entwickelt, um Eisenquellen aus der von ihrem Wirt gestellten Umgebung zu erschliessen.

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre haben erkennen lassen, dass Eisenversorgung und Eisenaufnahme entscheidende Faktoren hinsichtlich der Fitness und der Pathogenität von Mikroorganismen darstellen (Brown & Holden, 2002; Sokol et al., 1999; Bäumlner et al., 1993; Angerer et al., 1992; Griffiths et al., 1984; Yancey & Finkelstein, 1981; Hantke & Braun, 1975). So stehen ungezählte Virulenzfaktoren sowohl pro- als auch eukaryotischer Pathogene unter der Kontrolle eisenabhängiger Promotoren. Die Anzahl bekannter Proteine, welche positiv oder negativ eisenreguliert werden um den Bedarf an dieser Ressource zu decken, eine Infektion voranzutreiben, oder einen Zeitraum des Eisenmangels zu überbrücken ist nahezu unüberschaubar. So stellt beispielsweise die Polysaccharidkapsel von *Cryptococcus neoformans*, einem typischen AIDS-assoziierten Erreger, den wichtigsten Virulenzfaktor dar (Tangen et al., 2007). Das *cir*-Protein reagiert auf die Konzentration an freiem Eisen und reguliert neben dem zellulären Eisenhaushalt auch die Kapselbildung. Auch Siderophore zählen zu den Virulenzfaktoren, da ihre Bildung durch Bakterien eine direkte Antwort auf Eisenmangel ist (Hacker 2000; Braun, 2001 & 2005; Dale et al., 2006).

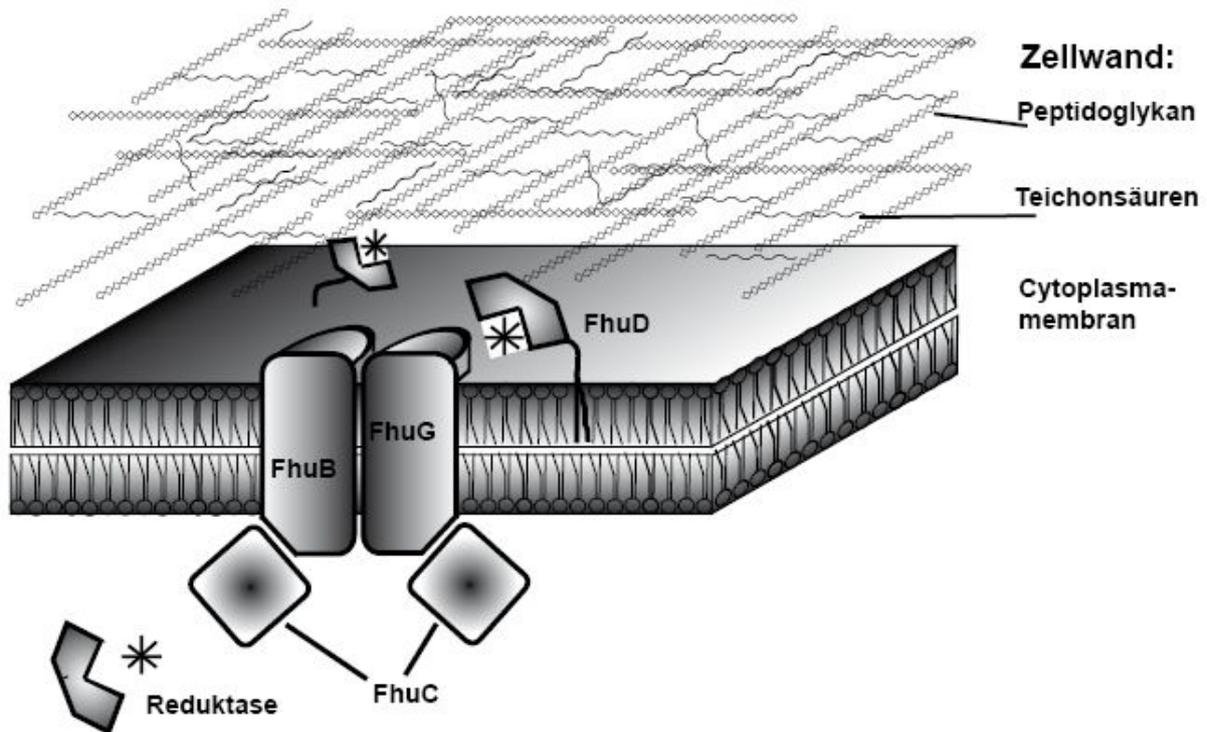
In Gram-negativen Bakterien findet die Kopplung der Eisenversorgung mit der Siderophorsynthese durch das Regulatorprotein Fur statt (Baichoo & Helmann, 2002). Bei ausreichender Eisenversorgung liegt Fur mit zwei gebundenen Eisenionen vor und

wirkt in diesem Zustand als Repressor. Eisenmangelsituationen führen zur Auflösung des Fur-Eisen-Komplexes und der Regulator bindet an DNA-Abschnitte mit spezifischen 19bp langen Palindromsequenzen (Fur-Box). Die Bindung von Fur an die Erkennungssequenz führt zur Expression der für den Eisenhaushalt der Zelle wichtigen Proteine (Hantke 2001). Bei Gram-positiven Bakterien erfüllen Proteine aus der DtxR Familie diese Funktion (Kunkle et al., 2005; Fuangthong et al., 2003).

### A.3. Die bakterielle Zellwand

Die bakterielle Zellhülle besitzt eine Vielzahl von Funktionen. Aufgrund ihrer geringen Grösse von durchschnittlich 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  weisen Mikroorganismen ein hohes Oberflächen : Volumen-Verhältnis auf. Um Zellstruktur und –funktionen in einer sich rasch wandelnden Umwelt aufrecht zu erhalten sind die Ansprüche an eine Zellbarriere enorm. Neben der Abgrenzung des Systems nach aussen bildet sie die Grundlage für eine kontrollierte Aufnahme und den Austausch von Substanzen. Die Gewinnung des primären Energieträgers ATP und damit der gesamte Energiehaushalt der Zelle sind meist abhängig von der Aufrechterhaltung eines Membranpotentials. Die Zellwand dient dem Strukturerehalt und besitzt eine Stützfunktion gegen äusseren und inneren Druck. Gleichzeitig muss sie flexibel sein, um Wachstum und Teilung zu ermöglichen. Um all den genannten Anforderungen zu entsprechen, setzt sich die bakterielle Zellwand aus der Kombination eines semi-permeablen, flexiblen Lipid-Bilayers mit einer polymeren Struktur aus quervernetzten Peptidoglykan-Molekülen zusammen.

Im Reich der Prokaryota haben sich zwei Hauptorganisationstypen der Zellhülle durchgesetzt, die man aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit in Gram-positiv und Gram-negativ unterteilt. Die Gram-positive Zellwand zeichnet sich durch die zahlreichen, auf die Zellmembran aufgelagerten, Schichten an Peptidoglykan (Murein) aus. Die Anwesenheit von Teichon- und Lipoteichonsäuren aus, die in sie eingelagert sind, ist ebenfalls ein Charakteristikum Gram-positiver Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (siehe Abb. A1). Die Struktur der Zellwand erfährt allerdings in zahlreichen Gram-positiven Spezies weitgehende Modifikationen, die von der oben beschriebenen abweichen. So zeichnet sich die Zellwand der Mykobakterien durch ihren hohen Anteil



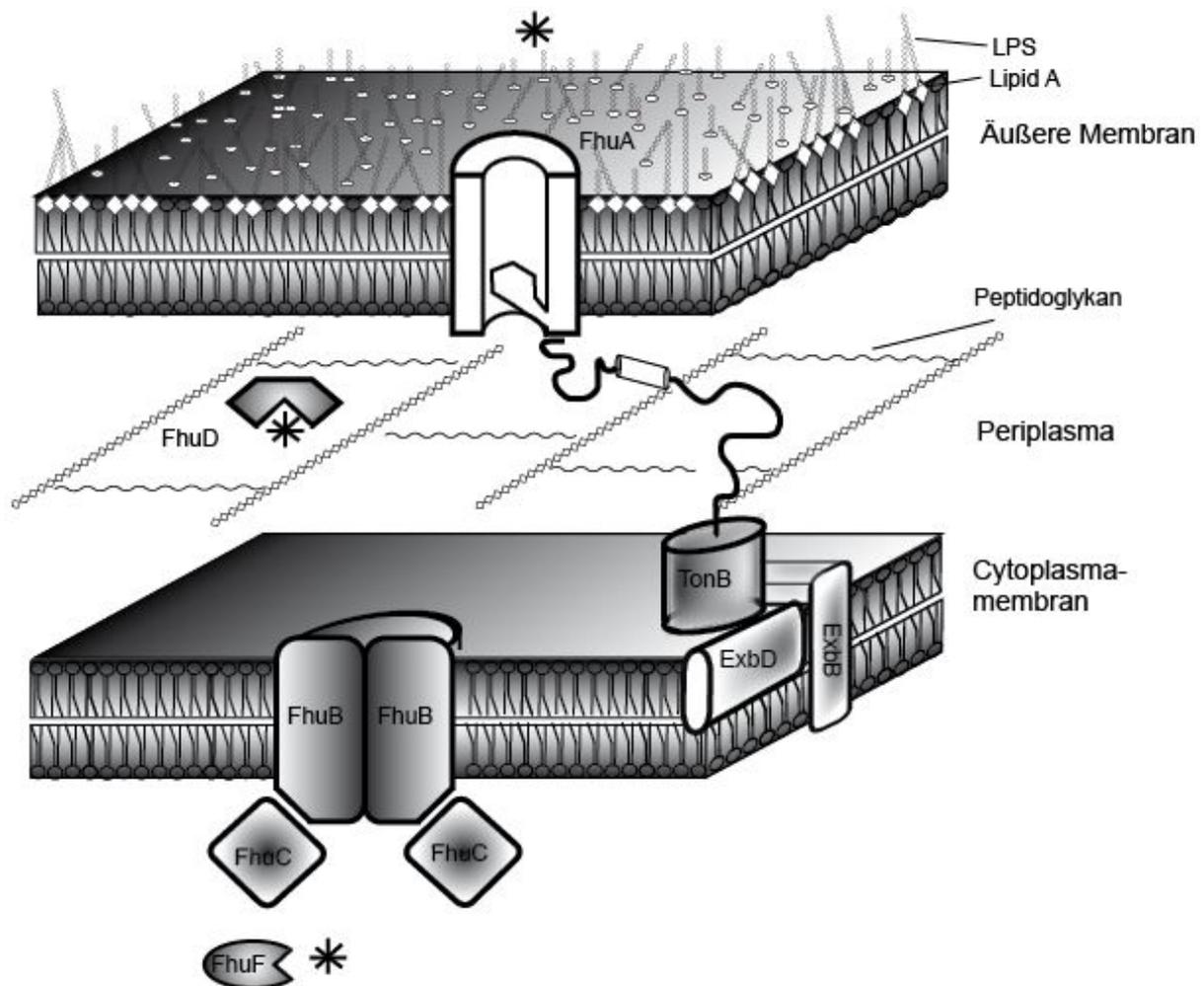
**Abb. A1:** Schematische Zeichnung der Gram-positiven Zellwand am Beispiel *Staphylococcus aureus*. In der Zeichnung abgebildet ist der Hydroxamataufnahmekomplex FhuCBG. Das Bindeprotein FhuD ist über einen Lipidanker in der Cytoplasmamembran verankert. FhuB und FhuG bilden den für den Transport über die Membran verantwortlichen Komplex, FhuC ist die energetisierende ATPase (nach Sebulsky et al., 2000).

langkettiger Fettsäuren (Mykolsäuren) aus, die ihnen beträchtliche Säurefestigkeit verleiht (Madigan & Martinko in: Biology of Microorganisms, 2005; Atlas R.M., 1997). Die Zellwand Gram-negativer Bakterien ist anders gestaltet. Neben der Cytoplasmamembran existiert eine zweite, äussere Membran. Diese ist nicht durch ein Membranpotential energetisiert und durch den periplasmatischen Raum von der Zellmembran getrennt. Charakteristisch für die äussere Membran sind die dort verankerten Lipopolysaccharide (LPS), welche wichtige Antigeneigenschaften besitzen. Die Mureinstruktur der Zellwand beschränkt sich bei Gram-negativen Bakterien auf wenige Schichten im Periplasma (siehe Abb. A2).

#### A.4. Bakterielle Eisenaufnahmesysteme

Die Eisenaufnahme Gram-positiver Bakterien wurde insbesondere an *B. subtilis* und *S. aureus* gut untersucht (Pramanik et al., 2006; Maresso & Schneewind, 2006; Klebba et al., 2006; Moore & Helmann, 2005). Die Siderophoraufnahme wird oftmals durch ubiquitär verbreitete ABC-Transporter bewerkstelligt (siehe Abb. A1). Ein in der

Cytoplasmamembran verankertes Lipobindeprotein wird in das umgebende Medium exponiert. Eisenbeladene Siderophore in der Umgebung werden von ihm hochspezifisch gebunden und dem Transportkomplex in der Cytoplasmamembran zugeführt. Mehrere membrandurchspannende Proteine bilden einen energieabhängigen Tunnel, der durch das Andocken des vom Bindepotein angereicherten Siderophors aktiviert wird. Die Energetisierung des Membrankomplexes findet durch eine cytosolische ATPase statt (Heinrichs et al., 2000; Schneider & Hantke, 1993). Die Eisenaufnahmesysteme durch die Cytoplasmamembran der Gram-negativen Bakterien entsprechen ebenfalls einem ABC-Transporter (siehe Abb. A2). Die Vitamin B12-Aufnahme und das Fhu-Aufnahmesystem von *E.coli* wurden bereits sehr gut untersucht (Locher et al., 2002; Köster et al., 1995 und 1998).

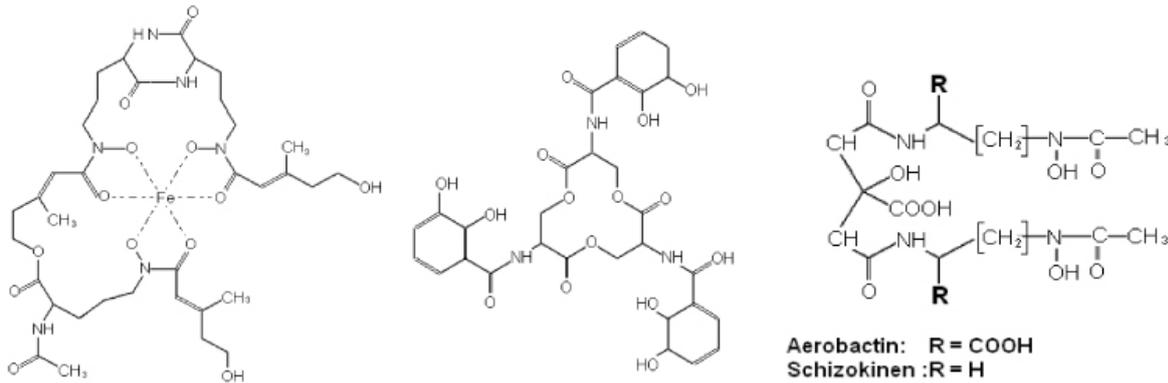


**Abb. A2:** Schema der Gram-negativen Zellwand (*E.coli*). Dargestellt ist der Fhu-Transportkomplex, dessen cytoplasmamembran-ständiger Teil homolog zum Fhu-Aufnahmesystem von *S. aureus* ist. Das Bindepotein FhuD ist als freier Carrier im periplasmatischen Raum lokalisiert. FhuA transportiert hochselektiv Siderophore vom Ferrichrom-Typ über die Äussere Membran. Die Energetisierung dieses Proteins wird über den TonB-ExbB/ExbD-Komplex bewerkstelligt.

Im Beispiel von *E.coli* erkennt der in der äusseren Membran lokalisierte, spezifische Transporter FhuA Ferrichrom als Substrat und schleust es aktiv in den periplasmatischen Raum. Dort wird es von einem löslichen Bindeprotein (FhuD) aufgenommen. Das Bindeprotein dient als Shuttle und führt das Siderophor an den Transportkomplex der Cytoplasmamembran (FhuCBG), welcher es in das Cytoplasma einschleust. Der Transport über die äussere Membran, wie auch über die Zellmembran muss energetisiert werden. Während der ABC-Transporter der Zellmembran eine cytoplasmatische ATPase beinhaltet (FhuC), wird die Energie für den äusseren Membrantransporter über einen noch nicht exakt erforschten Mechanismus von der Zellmembran übertragen. Hierfür verantwortlich ist ein weiterer membranständiger Komplex (TonB, ExbB/ExbD). TonB ist in der Lage, den periplasmatischen Raum auslegerartig zu überwinden und an bestimmte Sequenzbereiche zugänglicher Proteine anzudocken, womit eine Konformationsänderung bewirkt wird (Postle 2007; Wiener et al., 2006; Braun et al., 2005). Als Energiequelle dient die protonenmotorische Kraft der Cytoplasmamembran. *E. coli* besitzt mehr als sieben verschiedene Eisenaufnahmesysteme, die spezifisch für einen Typ von Siderophor sind (Grass 2006).

### A.5. Siderophore

Um Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ -Form) aus ihrer Umwelt aufnehmen und nutzen zu können, sekretieren zahlreiche Mikroorganismen niedermolekulare wasserlösliche Substanzen. Diese sind in der Lage, Eisen-Ionen mit hoher Affinität und Spezifität zu komplexieren. Die Moleküle stellen eine strukturell sehr inhomogene Gruppe dar und werden aufgrund ihrer Funktion als Siderophore zusammengefasst (griech.: sideros = Eisen, phorein = tragen). Anhand ihrer funktionellen Gruppen unterscheidet man Katecholate (wie Enterobactin und Salmochelin), Hydroxamate (zu denen Ferrichrom und Ferrioxamin zu rechnen sind) und Hydroxamat-Carboxylate wie das Aerobactin (Neilands, 1995). Zwei Hauptsynthesewege der Siderophore sind bislang untersucht worden. Siderophore mit Polypeptidcharakter werden von Proteinen aus der Multienzym-Familie der nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet, die auch hauptverantwortlich für die Bildung von Peptidantibiotika ist (Crosa & Walsh, 2002; Challis & Naismith, 2004). Siderophore vom Hydroxamat-Typ werden über einen alternativen Weg synthetisiert, der bislang noch wenig untersucht wurde.



**Abb. A3** : Strukturen einiger Siderophore – Coprogen (links), Enterobactin (mitte), Aerobactin bzw. Shizokinen (rechts).

Hierbei werden Dicarbonsäuren, Diamine und Aminoalkohole als Bausteine benutzt, die über Amid- und Esterbindungen verknüpft werden. Dieser sogenannte NIS-Pathway (NRPS-independent siderophore pathway) wird von einer Vielzahl Bakterien genutzt (Challis, 2005). Nachdem Siderophore Eisen gebunden haben, werden sie über spezifische aktive Transportsysteme in die Bakterienzelle geschleust. In der Zelle reduzieren Enzyme das Eisen und lösen es somit aus dem Komplex, so dass es für den Zellstoffwechsel zur Verfügung steht (Matzanke et al., 2004).

Oftmals sind Bakterien fähig, Siderophore artfremder Organismen (sog. Xenosiderophore) zu nutzen, sofern sie hierfür spezifische Transportkomplexe besitzen. So ist z. B. *Klebsiella pneumoniae* in der Lage, Yersiniabactin zu nutzen (Miller et al., 2006). Aus diesem Beispiel lässt sich schliessen, wie hoch der Konkurrenzdruck um die Ressource Eisen ist. Das Vorkommen von Siderophoren ist auch aus dem Reich der Pflanzen und der höheren Pilze bekannt (Budde & Leong, 1989; Castignetti & Smarelli, 1986).

## A.6. Sideromycine

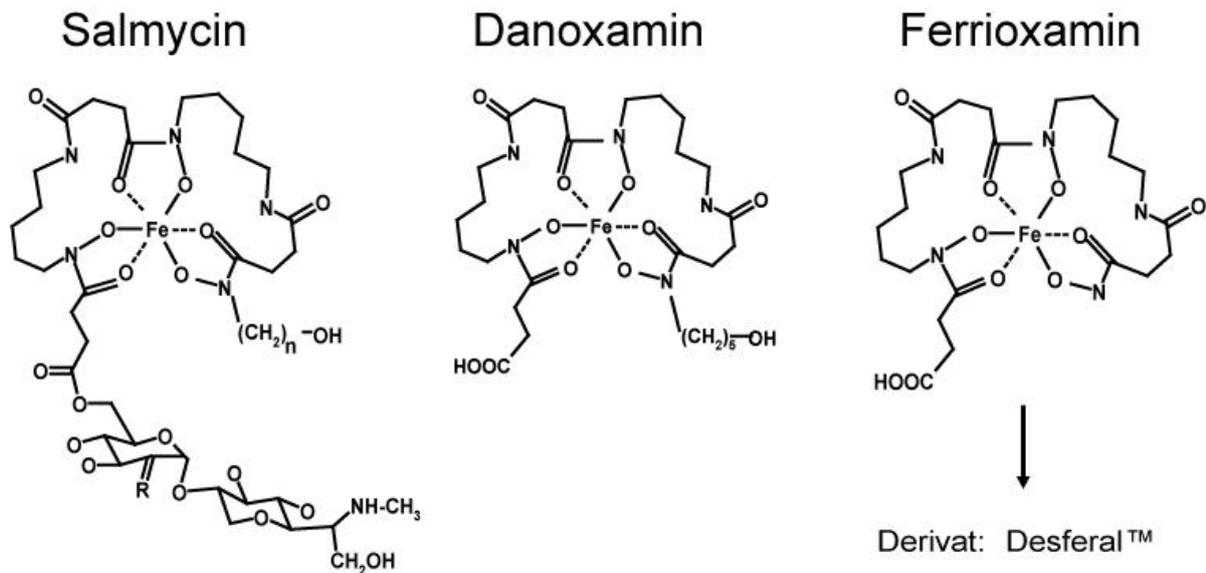
Die Antibiotika-Derivate der Siderophore werden in der Substanzklasse der Sideromycine zusammengefasst. Sie sind strukturverwandt zu den Siderophoren und unterscheiden sich von diesen oft nur durch zusätzliche Seitenketten (Miller et al., 1991). Neben dem Siderophoranteil besitzen sie eine antibiotisch wirksame Einheit (Diarra et al., 1996). Die Aufnahme erfolgt über die gleichen Transportsysteme wie bei den ihnen homologen Siderophore. Ihre Wirkung entfalten Sideromycine erst im Cytosol. Aufgrund dieser Taktik werden Sideromycine als „Trojanisches Pferde“ unter

den Antibiotika bezeichnet. Durch die aktive Aufnahme in die Zelle und die dadurch zustande kommende bis zu 1000-fache Anreicherung wirken Sideromycine wie Salmycin, Ferrimycin und Albomycin sehr selektiv und sind hochwirksam (Braun 2002 & 1999; Curtis et al., 1988; Vorisek & Grunberger, 1966; Bickel et al., 1966; Yamada & Kawaguchi, 1964; Sackmann et al., 1962; Gause, 1955). Aufgrund des Siderophoranteils besitzen Sideromycinlösungen stets eine charakteristische orange- bis rotbraune Färbung. Das bekannteste Antibiotikum aus dieser Substanzgruppe ist Albomycin, mit dessen Hilfe das Fhu-Transportsystem bei *E.coli* aufgeklärt wurde (Köster & Mademidis, 1998; Braun et al., 1995; Hartmann et al., 1979).

### A.7. Salmycin

Salmycin wurde erstmals von Vértesy et al. (1995) beschrieben, die es aus dem Aktinomyceten *Streptomyces violaceus* isolierten. Es handelt sich hierbei um ein Sideromycin vom Hydroxamattyp. Die Siderophoreinheit entspricht dabei einem modifizierten Ferrioxamin (Danoxamin), welches über eine Esterbindung mit einem Aminodisaccharid verknüpft ist. Der Aminozucker besteht aus einer Glucose, die  $\alpha$ -glycosidisch mit einer 6-Deoxy-6-(methylamino)-Heptapyranose verbunden ist. Er stellt das antibiotische Prinzip dar, wobei der Wirkort unbekannt ist. Aufgrund gewisser Strukturhomologien zu Aminoglykosidantibiotika ist ein ribosomales Target denkbar. Die Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* wurde in der Erstbeschreibung bereits erwähnt. Ein Austausch funktioneller Gruppen am ersten Zucker und die Variation der Länge der Methylseitenketten des Danoxamins führen zu unterschiedlichen Derivaten (Salmycin A-D, siehe Abb. A4). Im Bioassay mit *S. aureus* unterschieden sich diese Derivate durch verschieden klare Hemmhöfe. Das Molekulargewicht der Salmycine beträgt 1038 – 1052 g/mol. Exakte Daten zu Wirkspektrum, Aufnahme und Wirkmechanismus von Salmycin wurden bislang nicht publiziert. Die fehlenden Informationen zu Salmycin mögen im Zusammenhang mit der Forschung in der Firma Hoechst stehen.

Nach der Fusion von Hoechst mit Rhône-Poulenc im Jahr 1999 und der anschliessenden Übernahme durch Sanofi-Aventis wurden keine weiteren Studien publiziert und die Forschung an Salmycin offenbar eingestellt.



### Strukturformeln der Salmycin-Derivate

Salmycin A: R = NOH	n = 5	Salmycin C: R = O oder (OH) <sub>2</sub>	n = 4
Salmycin B: R = O oder (OH) <sub>2</sub>	n = 5	Salmycin D: R = NOH	n = 4

**Abb. A4** : Grundstruktur von Salmycin (links). Der Siderophoranteil entspricht einem in der Seitenkette modifizierten Danoxamin (Mitte), welches wiederum ein Derivat des Ferrioxamins (rechts) darstellt.

Eine synthetische Herstellung von Salmycin wurde von Miller et al. (2000) beschrieben, doch die geringe Ausbeute lässt weiterhin nur eine Produktion über Fermentation sinnvoll erscheinen. Ein Protokoll für die Salmycinproduktion in kleinem Maßstab wurde nicht publiziert. Das veröffentlichte Protokoll beschreibt die Fermentation im 300 l-Maßstab und ist aufgrund der geringen Ausbeute auf kleinere Ansätze nur bedingt übertragbar.

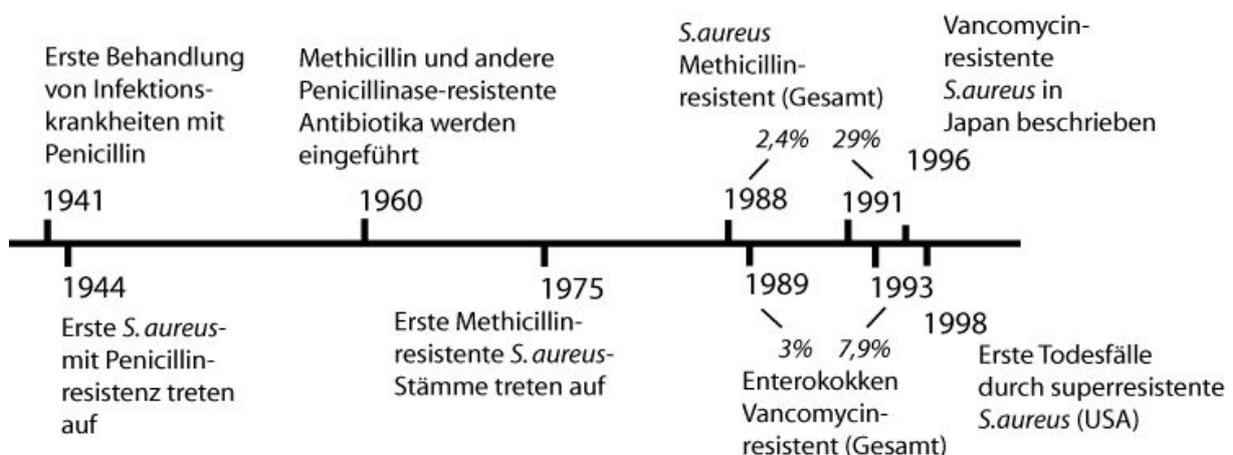
## A.8. Antibiotikaresistenzen und Aussichten

Die Einführung von Antibiotika in die klinische Anwendung zur Bekämpfung bakterieller Infektionen begann mit der Grossproduktion und Vermarktung von Penicillin ab dem Jahr 1943. Die Mortalität zahlreicher Erkrankungen sank drastisch und die Lebenserwartung der Menschen in entwickelten Ländern stieg aufgrund der Entdeckung von Antibiotika und Impfstoffen um etwa 20 Jahre an (Todar, K. in: Textbook of Bacteriology, 2002). Im Jahr 1952 kam mit Streptomycin das erste Antibiotikum zur Bekämpfung von Tuberkulose auf den Markt und Optimisten postulierten, dass alle bakterielle Infektionen in Zukunft heilbar und die grossen

Seuchen bald Vergangenheit sein würden. Bis in die 1980er Jahre folgten rasch hintereinander die Entdeckungen zahlreicher neuer Antibiotika-Klassen. Doch schon im ersten Jahr nach der Einführung von Penicillin wurde über Resistenzen berichtet (Rammelkamp & Keefer, 1943).

Bis Anfang der 1980er Jahre stellten Resistenzentwicklungen kein ernstzunehmendes Problem dar, da die Entwicklung verbesserter Wirkstoffe schneller voranschritt als das Auftreten und die Ausbreitung von Resistenzen. Aufgrund hoher Entwicklungskosten und der breiten Palette an Konkurrenzprodukten wurde die pharmazeutische Forschung an neuen Antibiotika nach und nach verringert.

Nur 50 Jahre nach dem Aufkommen der Antibiotika war jedoch offensichtlich, dass die Schwerter gegen pathogene Mikroorganismen stumpf zu werden drohten, nachdem ab Mitte der 80er und zu Beginn der 90er Jahre in Krankenhäusern in Japan und den USA erstmals multiresistente Erreger beschrieben worden waren (Deguchi et al., 1985; Jacoby, 1996).



**Abb. A5 :** Entwicklung der Antibiotikaresistenz seit Einführung des Penicillins (modifiziert nach Simon, A.E., 2001).

Die Situation verschlechterte sich bis zum heutigen Tag weiter dramatisch: multiple Resistenzen sind aus allen Gruppen infektiöser Keime bekannt und oftmals versagen die Mittel der Wahl. Insbesondere in Krankenhäusern stellen nosokomiale Infektionen für ein breites Spektrum an Patientengruppen eine ernstzunehmende Gefahr dar (McQuigge, 2001). Zwischenzeitlich tauchen bereits erste Resistenzen gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin oder Linezolid auf (Alanis 2005; Barrett & Barrett, 2003).

Aus diesen Gründen ist die Suche nach Antibiotika wieder hochaktuell geworden. Insbesondere neuartige Mechanismen mit geringen Tendenzen zur Resistenzbildung hinsichtlich neuer Wirkorte, aktiver Aufnahme, sowie antimikrobielle Peptide, befinden sich im Fokus der wissenschaftlichen Forschung (Su et al., 2007; He et al., 2007, Peschel et al., 2006). Sideromycine wie Salmycin stellen aufgrund ihrer aktiven Einschleusung und der darauf beruhenden Spezifität, sowie ihrer intrazellulären Anreicherung möglicherweise geeignete Kandidaten dar (Budzikiewicz, 2001).

### **A.9. Ziele dieser Arbeit**

Das Antibiotikum Salmycin wurde 1993 erstmals aufgereinigt und beschrieben, jedoch fehlen bis heute öffentlich zugängliche Daten zu Wirkspektrum, Bioaktivität und Aufnahme durch die Bakterienzelle.

In der vorliegenden Studie soll mit dem Stamm *Streptomyces violaceus* DSM 8286 Salmycin im kleinen und mittelgrossen Maßstab produziert, das Produktionsmedium optimiert und die Aufreinigung modifiziert werden.

In einem zweiten Teil wird das Wirkspektrum von Salmycin anhand relevanter Pathogene aus Klinikisolaten und Stammsammlungen der Universität Tübingen bestimmt. Eine MHK-Bestimmung soll an ausgewählten Pathogenen durchgeführt werden.

Des Weiteren soll das Aufnahmesystem bei sensitiven Keimen identifiziert und Faktoren untersucht werden, die das Auftreten von Resistenzen determinieren.

Zuletzt werden Studien durchgeführt, welche die Zytotoxizität an eukaryotischen Zellen und die *in-vivo*-Wirksamkeit von Salmycin im Maus-Modell untersuchen, um Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Einsatz zu erhalten.

## B. Material und Methoden

### B.1. Material

#### B.1.1. Chemikalienliste

##### *B.1.1.1. Labor-Chemikalien*

Die Standardchemikalien wurden von Boehringer, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Andere Chemikalienlieferanten werden gesondert genannt.

Agarose Gold	Casaminosäuren (Difco)
(L)-Cystein	Bacto-Agar (Difco)
Bacto-Trypton (Difco)	Borsäure
Bromphenolblau	Bromothymolblau
Chloroform	Coomassie-Blau
DMEM-Medium	dNTPs (Roche)
EDTA	Eisessig
Ethanol	Ethidiumbromid
Glucose	Glucose-6-Phosphat
Glycerol	Harnstoff
Hefe-Extrakt	HCl
Isopropanol	LiCl
KCl	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumtellurit
MacConkey Agar Base (Difco)	Malzextrakt
Mannitol (D-Mannit)	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>
Mueller-Hinton Broth	NaCl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaOH
NH <sub>4</sub> Cl	NTA
Nutrient Broth (Difco)	(L)-Ornithin
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Proteose Pepton
Sodiumdodecylsulfat, SDS	Sojamehl (Hensel)
Stärke, löslich	Sucrose

Todd-Hewitt Agar Base	Tris-Base
Triton-X	Trypsin-Inhibitor
UltimaGold®	Vogel-Johnson Agar Base (Difco)

**B.1.1.2. Antibiotikazusätze (eingesetzte Konzentrationen)**

Ampicillin:	50 µg/ml	- 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> + NaOH
Chloramphenicol:	40 µg/ml	- 40 mg/ml in 70% EtOH
Kanamycin:	10 µg/ml	- 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
Tetracyclin:	13 µg/ml	- 13 mg/ml in 70% Ethanol

Im Tierversuch:

Rifampicin	10 mg/kg	- 1,25 mg/ml in 10% DMSO
Vancomycin	20 mg/kg	- 2,5 mg/ml H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>

**B.1.1.3. Eisenchelatoren**

2'-2,-Dipyridyl	<i>Sigma</i>
EDDHA	<i>dieses Institut</i>
Desferrichrom	<i>Tübinger MicroCollections</i>
Desferrioxamin (Desferal®)	<i>Sigma</i>

**B.1.1.4. Siderophore und Sideromycine**

Die hier aufgezählten Siderophore wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Hantke und Dr. Silke Patzer zur Verfügung gestellt. Albomycin stammt von Pramanik (2006).

Aerobactin	Albomycin	Coprogen
Ferrimycin	Ferrioxamin B	Ferrichrom
Rhodotorulasäure	Shizokinen	

## **B.1.2. Puffer und Lösungen**

### ***B.1.2.1. Agarosegel-Puffer***

#### TAE-Puffer (50x)

Tris-Base	242,0 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1,0 l

#### TE-Puffer (10x)

Tris 100 mM
EDTA 10 mM ( pH 7,5)

#### DNA-Ladepuffer (10X)

Bromphenolblau	25,0 mg
SDS 10%	1,25 ml
Glycerol	12,50 ml
Tris 10 mM	6,25 ml

#### PBS (10x)

NaCl	80,0 g/l
KCl	2,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g/l

### ***B.1.2.2 SDS-PAGE***

#### 12% Trenngel (Ansatz für 2 Midi-Gele)

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	9,20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	7,40 ml
Trenngelpuffer	5,74 ml
SDS (10 %)	115,0 µl
APS	46,0 µl
TEMED	57,5 µl

#### Trenngelpuffer

Tris/HCl	36,3 g (1,5 M)
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	200 ml
	pH 8,8

#### Sammelgel (4,2 %)

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	1,72 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	4,0 ml
Sammelgelpuffer	6,3 ml
SDS (10 %)	120 µl
APS	80 µl
TEMED	30 µl

#### Sammelgelpuffer

Tris/HCl	6,1 g (0,25 M)
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	200 ml
	pH 6,8

Ladepuffer (5x, nach Lugtenberg)

Tris/HCl (1 M, pH 6, 8)	1,9 ml	(3, 8 %)
SDS	5,0 g	(10 %)
Glycerol	25,0 ml	(50 %)
Mercaptoethanol	12,5 ml	(25 %)
Bromphenolblau	12,5 ml	(2, 5 %)
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 50,0 ml	(8, 7 %)

Laufpuffer (10x)

Tris/HCl	30,2 g
Glycin	188,0 g
SDS (10 %)	100,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1,0 l

Färbelösung (mehrfach verwendbar)

H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	100 ml	(10 % w/v)
Methanol	450 ml	(45 % w/v)
Eisessig	450 ml	(45 % w/v)
Coomassie Brilliant Blue	2, 5 g	

Entfärbelösung

H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	500 ml	(50 % w/v)
Methanol	400 ml	(40 % w/v)
Eisessig	100 ml	(10 % w/v)

**B.1.2.3. His-Tag-Aufreinigung**

Lysepuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g	50 mM
NaCl	8,8 g	300 mM
Imidazol	340 mg	10 mM
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1000 ml	

Waschpuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g	50 mM
NaCl	8,8 g	300 mM
Imidazol	680 mg	20 mM
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1000 ml	

Elutionspuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g	50 mM
NaCl	8,8 g	300 mM
Imidazol	17,0 g	250 mM
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1000 ml	

**B.1.3. Nährmedien**

Medien werden – wenn nicht gesondert vermerkt - in einfacher (1x) Konzentration für ein Volumen von 1 l angegeben.

Sofern nicht anders erwähnt wurden für feste Medien folgende Mengen Agar benutzt:

Für Festagarplatten: 16 g/l Difco Bacto-Agar

Für Topagar: 10 g/l Difco Bacto-Agar

**TY**

Bacto Tryton	8 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

**LB**

Bacto Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

**NB**

Nutrient Broth	8 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

**THY-Medium** (Streptokokken)

Todd-Hewitt Base	30 g
Hefe-Extrakt	5 g

**TB** (ergibt höhere Zelldichte)

<b>(1)</b>	<b>(2)</b>
Hefeextrakt            12 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12,5 g
Casein-Verdau        24 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,3 g
Glycerol                4 ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> ad 100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> ad 900 ml	

*Lösungen (1) und (2) werden getrennt autoklaviert und nach Abkühlen auf 60°C zusammengegeben.*

**Vogel-Johnson-Agar**

Vogel –Johnson Base	61 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

*Nach Abkühlen werden 20 ml*

*1 % Kaliumtelluritlösung hinzugefügt.*

**MacConkey-Agar**

MacConkey Agar Base	40 g
Lactose	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

**SOC**

<b>(1)</b>	<b>(2)</b>
Trypton                    2,0 g	Getrennt autoklavieren und später
Hefeextrakt            0,5 g	steril filtriert zugeben.
NaCl                        50 mg	MgCl                    10 mM
KCl                         250 µg	MgSO <sub>4</sub> 10 mM
NaOH (1M)            20 ml	Glucose                20 mM
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> ad 100 ml	

**Blutagar**

Mueller-Hinton Broth	23 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

**Mueller-Hinton-Agar**

Mueller-Hinton Broth	23 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

*Zugabe von 5 ml pro 100 ml sterilem Schafserythrozytenkonzentrat nach Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C.*

### **B.1.4. Medien für Radioaktivtransporte**

**TMS** (Minimal-Medium für *S. aureus*; Lösung 1 und 2 werden getrennt hergestellt)

<b>(1) TMS-Stammlösung (25x)</b>		<b>(2) Supplemente</b> (steril filtrieren)	
NaCl	145 g	MgCl <sub>2</sub>	950 mg
KCl	92,5 g	CaCl <sub>2</sub>	110 mg
NH <sub>4</sub> Cl	27,5 g	Tryptophan	200 mg
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,55 g	Cystein	220 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g	Thiamin	170 mg
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l	Nicotinsäure	12 mg
		Panhotensäure	5 mg
		Biotin	0,1 mg
		H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 100 ml

#### **(3) Hauptmedium**

TMS-Stammlösung (1)	40 ml
Tris Base	12,1 g
Succinat	16,6 g
Casaminosäuren 20 %	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 800 ml

*Auf pH 7,4 einstellen und autoklavieren.*

*Danach werden 10 ml Supplemente (2) hinzugefügt und mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> auf 1 l aufgefüllt.*

#### **M9-Minimal-Medium (*E. coli*)**

M9-Salze (10x)	100 ml
Glucose (40%)	10 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
0,1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 ml
Thiamin (1 mg/ml)	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

#### **M9-Salze (10x)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l

### **B.1.5. Medien für Streptomyceten**

#### **KM4-Medium (GYM)**

Glucose	4 g	
Hefeextrakt	4 g	
Malzextrakt	10 g	
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l	<i>Vor dem Autoklavieren auf pH 7.3 einstellen.</i>

#### **Soja-Mannitol-Komplexmedium**

Sojamehl	20 g	
Mannitol	20 g	
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1 l	<i>Vor dem Autoklavieren auf pH 7.3 einstellen.</i>

#### **Definiertes Albomycin-Produktionsmedium (Fiedler et al., 1985)**

##### **(1) (autoklavieren)**

Stärke, löslich	15 g
Saccharose	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 g
NaCl	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 900 ml

##### **(2) (steril filtrieren)**

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,8 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,28 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 100 ml

*Gesamtansatz auf pH 7,0 einstellen.*

#### **ISP4 (Sporulationsmedium)**

Stärke, löslich	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
BactoAgar	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	Ad 1 l

*Steril filtrieren und nach dem Autoklavieren  
hinzufügen:*

FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1 mg
MnCl <sub>2</sub> x7H <sub>2</sub> O	1 mg
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1 mg

*Auf pH 7,2 einstellen.*

**B.1.6. Kits und Antikörper**

Expand High Fidelity PCR-Kit	<i>Roche</i>
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep-Kit I	<i>Peqlab</i>
Nucleobond AX Midi-Prep-Kit	<i>Macherey-Nagel</i>
Easy-DNA Extraction Kit	<i>Invitrogen</i>
QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i>
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	<i>Roche</i>
BCA™ Protein Assay Kit	<i>Pierce</i>
SURVEOY® Mutation Detection Kit	<i>EpiCentre/Transgenomic</i>
His-Tag Ni-NTA-Spin Columns	<i>Qiagen</i>
Ni-NTA Purification Kit	<i>Qiagen</i>
PageRuler Prestained Marker	<i>Fermentas</i>
PageRulerPlus Prestained Marker	<i>Fermentas</i>

**B.1.7. Enzyme**

Alkalische Phosphatase (CIP)	<i>Roche</i>
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	<i>New England Biolabs</i>
Lysostaphin	<i>genmedics GmbH</i>
Lysozym	<i>Sigma</i>
Phusion-Polymerase	<i>Finnzyme</i>
Proteinase K	<i>Roche</i>
Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs, Roche</i>
RNaseA	<i>Roche</i>
T4 DNA Ligase	<i>New England Biolabs</i>
<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Peqlab</i>
Trypsin	<i>Roth</i>

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt.

**B.1.8. Primer**

**Tab. B-I :** Verwendete Oligonukleotide (bezogen von Thermohyaid, Ulm)

Bezeichnung	Spezies	Sequenz (5' – 3')	GC %
FhuD2 - D1 F	<i>S.aureus</i>	GGA TTA CAC AAT CCA CCT ATG GAA GAT G	43
FhuD2 - D2 R	<i>S.aureus</i>	GCA ACT TTT TCT ACA TCG CCA TCA CC	46
FhuD2 - D3 F	<i>S.aureus</i>	GGT GTT ACA AAA ATT GGT GAT GGC GAT G	43
FhuD2 - D4 R	<i>S.aureus</i>	GAT ATG TTT CAG ACT CTC ATT TCA CTA AC	34
FhuB – 1F	<i>S.aureus</i>	CTG GAA AAC CTT TAC TGG TAA CTT ATG AC	38
FhuB – 2R	<i>S.aureus</i>	CTC CAG CAG TCC AAA ATG TTA CTG TTT G	43
FhuB – 3F	<i>S.aureus</i>	GTG CTA TGT TAA CAG CGC TAA GTC AAG G	46
FhuB – 4R	<i>S.aureus</i>	CCT GAG GTA ATA CTC CAA GTA CAA CCT A	43
FhuG – 5F	<i>S.aureus</i>	GGA GAA GCG CCT GTT GGT GCA ATC ATT TC	52
FhuG – 6R	<i>S.aureus</i>	CCA AGC AGC GAT GAA ATC AGA TTG ATT A	39
FhuG – 7F	<i>S.aureus</i>	GGT TTA CAA ACA GCA TTA TAT GGT GGC TC	41
FhuG – 8R	<i>S.aureus</i>	GTG CCT TTC ATA GCA ATA AGT TGT GTC CA	41
FhuC – 9F	<i>S.aureus</i>	GAA CTA TGA AGA CTT ATC TGT GGG CGT	44
FhuC – 10R	<i>S.aureus</i>	GAA CGG TGT CGG AAT GTA TCA GTT CCT G	50
FhuC – 11F	<i>S.aureus</i>	GGA TTT GGT AGA TTA ACT GCT GAG GA	42
FhuC – 12R	<i>S.aureus</i>	ATT GTA GAG GCT TGA ATT TTG GCG TCA CC	45
Yent_FoxA_bamH1	<i>Yers.ent.</i>	GA <del>ACT</del> TATGGATCCACGATATGT	
Yent_FoxA_hind3	<i>Yers.ent.</i>	GATT CAA GCT TGC CAT GAT ATT	
FhuD2_kpn1_F	<i>S.aureus</i>	GAT AAT CAG GTA CCA TAG GAG GAA ATT A	54
FhuD2_ecoRI_R	<i>S.aureus</i>	CAG ACT CTG AAT TCG CTA ACT TAT A GC	51

### B.1.9. Plasmide und Vektoren

**Tab. B-II :** Verwendete Vektoren (MCS= multiple Klonierungsstelle)

<b>Name</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Schnittstellen</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Quelle</b>
pFU2	trägt FoxA <sub>Yers</sub>	-	Amp	Schneider & Hantke
pMR20	trägt FhuD <sub>E.coli</sub>	-	Amp	Rohrbach & Braun
pGEX 4T-3	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine (Promotor unter T7-Kontrolle, IPTG-Induktion)	(MCS)	Amp	Amersham
pBR322	low-copy-Vektor	-	Tet/Amp	NEB
pDrive	Klonierungsvektor	(MCS)	Amp/Kan	Qiagen
pBad/Myc-His C	Expressionsvektor für His-Tag-Fusionsproteine (Arabinose-Induktion)	(MCS)	Amp	Invitrogen
pTG1	Derivat von pGex4T-3, trägt FhuD2 <sub>S.aureus</sub> ohne Lipidanker	BamHI/ EcoRI	Amp	diese Arbeit
pTG2	wie pTG1	BamHI/ EcoRI	Amp	diese Arbeit
pTG3	Derivat von pGex4T-3, trägt FhuD2 <sub>S.aureus</sub> ohne Lipidanker	BamHI/ EcoRI	Amp	diese Arbeit
pTG4	wie pTG1	BamHI/ EcoRI	Amp	diese Arbeit
pTG5	Derivat von pDrive mit FoxA <sub>Y.enterocolitica</sub>	BamHI/ HindIII	Amp/Kan	diese Arbeit
pTG6	Derivat von PBad/Myc-His C mit komplettem FhuD2 <sub>S.aureus</sub>	KpnI/ EcoRI	Amp	diese Arbeit
pTG7	Derivat von pBR322 mit komplettem FoxA <sub>Y.enterocolitica</sub>	EcoRI/ HindIII	Tet/Amp	diese Arbeit

### B.1.10. Verwendete Laborstämme

Tab. B-III : Verwendete Laborstämme für Fermentation, Klonierung und Expression, sowie Wildtypstämme und Stämme für Radioassays.

Name	Stamm	Eigenschaften	Herkunft
<b><i>E. coli</i></b>	JE3815	Chromosomale $\Delta$ tatC-Mutante, führt zu fehlendem FhuD	Keio-Collection, Japan
	AB2847	Kontrollstamm, keine Aerobactin-Produktion	dieses Institut
	MB97	$\Delta$ FhuA	dieses Institut
	HK1857	$\Delta$ TonB	dieses Institut
	BL21 (DE3)	Expressionsstamm mit T7 DNA-Pol. unter <i>lac</i> -Kontrolle	dieses Institut
	DH5 $\alpha$	Kompetenter Stamm	dieses Institut
	5K	Kompetenter Stamm	dieses Institut
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	SAL-7	Fhu-Mutante mit Spontanresistenz SAL <sup>R</sup> /ALB <sup>S</sup>	diese Arbeit
<b><i>B. subtilis</i></b>	168 (SB164)	aroB	dieses Institut
	SPA2	168; <i>Tn917lac</i> in <i>fhuBC</i>	Schneider & Hantke
	SPA4	168; <i>Tn917lac</i> in <i>fhuD</i>	Schneider & Hantke
	SPF6	168; <i>Tn917lac</i> in <i>yxeB</i>	Schneider & Hantke
<b><i>S. aureus</i></b>	RN6390	phagenkurierter Wildtyp, Teststamm für Bioaktivität	Institut für Mikrobielle Genetik, Tübingen
	COL	genet. def. MRSA-Stamm	Institut für Mikrobielle Genetik, Tübingen
	Mu50	genet. def. VRSA-Stamm	Institut für Mikrobielle Genetik, Tübingen
	H364	$\Delta$ FhuD2	Heinrichs et al.
	H430	$\Delta$ FhuD1	Heinrichs et al.
	H431	$\Delta$ FhuD1/FhuD2	Heinrichs et al.
	SAL54	$\Delta$ FhuC, Spontanmutation	diese Arbeit
	SAL63	$\Delta$ FhuC, Spontanmutation	diese Arbeit
	SAL83	$\Delta$ FhuD2, Spontanmutation	diese Arbeit
	SAL224	$\Delta$ FhuB, Spontanmutation	diese Arbeit
	ALB120	$\Delta$ FhuB, Spontanmutation	diese Arbeit
<b><i>Str. violaceus</i></b>	DSM 8286	Salmycin-Produzent	DSMZ; Vértesy et al.

### B.1.11. Untersuchte Patientenisolat

Tab. B-IV : Patientenisolat für Plattendiffusionsassays

#### Gram-negativ

*Escherichia coli* 294  
*Escherichia coli* 295.1  
*Escherichia coli* 429  
*Escherichia coli* 430  
*Escherichia coli* MS 172  
*Shigella dysenteriae* 82  
*Shigella dysenteriae* 91  
*Shigella flexneri* 6B  
*Shigella flexneri* 6A  
*Shigella sonnei* 5B  
*Klebsiella pneumoniae* VA 24255  
*Klebsiella pneumoniae* VA 120659  
*Salmonella heidelberg* 1H  
*Salmonella enteritidis* ST 4519  
*Salmonella enteritidis* ST 18  
*Proteus mirabilis* VA 120700  
*Proteus mirabilis* VA 120665  
*Proteus mirabilis* VA 24495  
*Proteus vulgaris* VA 120796  
*Proteus vulgaris* VA 120597  
*Serratia liquefaciens* EB 1167  
*Serratia liquefaciens* EB 1134  
*Serratia marcescens* VA 24710  
*Serratia marcescens* VA 24707  
*Serratia marcescens* VB 304  
*Pseudomonas aeruginosa* VA 120936  
*Pseudomonas aeruginosa* VR 11565  
*Yersinia enterocolitica* WAC

#### Gram-positiv

*Staphylococcus aureus* VA 24817  
*Staphylococcus aureus* VA 24065  
*Staphylococcus aureus* VA 24500  
*Streptococcus agalactiae* BU 416  
*Streptococcus agalactiae* BU 308  
*Streptococcus pyogenes* 52  
*Streptococcus pyogenes* BU 60  
*Streptococcus pyogenes* BU 63  
*Listeria monocytogenes* S33  
*Listeria monocytogenes* BU 168  
*Enterococcus faecium* VA1207001  
*Enterococcus faecium* VA 120514  
*Enterococcus faecium* VA 120911  
*Enterococcus faecalis* VA24250  
*Enterococcus faecalis* VA24383  
*Enterococcus faecalis* VA 24368

## B.1.12. Geräte und Laborhilfsmittel

### B.1.12.1. Laborgeräte

Agarosegelelektrophoresekammer	<i>Bethesda research laboratories H5</i>
Autoklav	<i>KSG</i>
Brutschrank	<i>Heraeus</i>
Feinwaage	<i>Sartorius</i>
Fermenter	<i>Giovanola b20</i>
Fraktionssammler	<i>LKB Ultrorac 7000 Fraction Collector</i>
Gel-Dokumentation	<i>Pharmacia - Biotech</i>
GenePulser	<i>BioRad</i>
Heizblock	<i>Gebr. Liebisch Bielefeld Mod. 20991</i>
HPLC	<i>Shimadzu LC-10, AT</i>
HPLC-Säulen	<i>Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch</i>
Lyophilisierung	<i>Leyboldt-Heraeus GT2</i>
Magnetrührer- und Heizplattenkombination	<i>IKAMAG RCT / Heidolph</i>
Mikrotiterplatten-Scanner	<i>Microtek</i>
Power Supplies für Gelkammer	<i>Biometra</i>
Rotationsverdampfer	<i>Büchi</i>
Schüttler	<i>New Brunswick Scientific Model G76</i>
Sequenzierautomat	<i>Applied Biosystems 3130xl</i>
Sterilbank	<i>Heraeus LaminAir HLB 2448 GS</i>
Thermocycler	<i>Biometra PersonalCycler P</i>
Vakuumpumpe	<i>Vacubrand MC-2Z</i>
Vortexgerät	<i>Bender und Hobein AG, K-550-GE</i>
Waage	<i>Sauter</i>
Zentrifugen	<i>Heraeus, Christ, Kontron</i>
Zentrifugenrotoren	<i>Kontron</i>

**B.1.12.2. Sonstige Laborgeräte**

## Glaswaren

Schikanekolben 100 – 3000 ml	<i>Schott</i>
Bechergläser 10 – 1000 ml	<i>Schott</i>
Schliffkolben 50 – 1000 ml	<i>Schott</i>
Glaspipetten 0, 1 – 20 ml	<i>Schott</i>
Chromatographiesäulen, versch. Grössen	<i>Schott</i>
Glasflaschen	<i>div. Hersteller</i>
Reagenzgläser 3 – 15 ml	<i>Schott</i>
Kühl-Gefrierkombination	<i>Liebherr</i>
Mikrowellenofen	<i>Liebherr</i>
Pipetten für 20, 200, 1000 µl, sowie 10 ml Volumen	<i>Gilson / Eppendorf</i>

**B.1.12.3. Verbrauchsmaterial**

Einmal-Küvetten	<i>Sartorius</i>
GenePulser Küvetten 0, 2 cm	<i>Bio-Rad</i>
Labortimer	<i>Roth</i>
Nitrocellulosefilter (25 mm, 0,45 µm)	<i>Pall (VWR)</i>
Pipettenspitzen für 1 – 10 ml	<i>Salstaed</i>
Papierfilter	<i>MN</i>
Pasteurpipetten	<i>Schott</i>
Q-Tips	<i>EDEKA</i>
Reaktionsgefässe zu 0, 2 ml, 0, 5 ml, 1, 5 ml und 2 ml	<i>Eppendorf</i>
Rührfische	<i>Roth</i>
Taschenrechner	<i>Texas Instruments</i>
Zahnstocher	<i>EDEKA</i>

### B.1.13. Hardware

Die Auswertung von Daten erfolgte auf Windows-PCs mit Intel Pentium-Prozessoren 800 MHz bis 3.0 GHz

### B.1.14. Software und Datenbanken

MS-Office XP	<a href="http://www.microsoft.com/">http://www.microsoft.com/</a>
Adobe Creative Suite 2	<a href="http://www.adobe.com/de/products/creativesuite/">http://www.adobe.com/de/products/creativesuite/</a>
SigmaPlot 2001	<a href="http://www.systat.com/products/sigmaplot/">http://www.systat.com/products/sigmaplot/</a>
Finch-TV	<a href="http://www.geospiza.com/finchtv/">http://www.geospiza.com/finchtv/</a>
Netprimer	<a href="http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html">http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html</a>
XnView	<a href="http://xnview.softonic.de/">http://xnview.softonic.de/</a>
Chromas	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
Bioedit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
ISIS-Draw 2.5	<a href="http://www.mdli.com/">http://www.mdli.com/</a>
ClustalX	<a href="ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/">ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/</a>
TreeView	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>
EMBL	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a>
JUMBO	<a href="http://imib.uni-muenster.de/fileadmin/template/conf/imib/lehre/skripte/biomasche/jumbo.html">http://imib.uni-muenster.de/fileadmin/template/conf/ imib/lehre/skripte/biomasche/jumbo.html</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
SWISS-Prot	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
NNPredict	<a href="http://alexander.compbio.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html">http://alexander.compbio.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html</a>
PredictProtein	<a href="http://www.predictprotein.org/">http://www.predictprotein.org/</a>

## **B.2. Methoden**

### **B.2.1. Haltung von Streptomycceten**

#### ***B.2.1.1 Kultivierung***

Alle Streptomycceten wurden zunächst 48 h, ggf. länger, in KM 4-Flüssigkultur herangezogen und zur Lagerung auf Platten (ISP 4 oder KM 4) ausgestrichen. Zur kurzfristigen Lagerung von Streptomyccetenkulturen wurden aussporulierte Plattenkulturen getrocknet und die Agarbruchstücke in sterile Falcon-Tubes überführt. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden Nährmedien mit einzelnen Fragmenten aus den Tubes beimpft.

#### ***B.2.1.2 Sporengewinnung***

Zur Gewinnung von Sporenmaterial wurden sporulierte Plattenkulturen (KM 4) mit 5 ml- Salinelösung (+ 10% Glycerol) beträufelt und einige Minuten vorsichtig geschwenkt. Der Lösung wurde danach mit einer Pasteurpipette aufgenommen, abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die am Boden des RG abgelagerten Sporen wurden resuspendiert und in Glycerolkultur tiefgefroren.

### **B.2.2. Salmyccinproduktion**

#### ***B.2.2.1. Fermentation im kleinen Maßstab***

Zur Optimierung der Fermentationsparameter wurde in 100 und 250 ml kultiviert. Die Vorkultur wurde 60 h inkubiert und der Hauptkultur im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Die Fermentation erfolgte in 1-Liter-Schikanekolben mit Wattestopfen. Es wurde entweder Soja-Mannitol-Medium oder definiertes Albomyccin-Produktionsmedium verwendet. Zur Feststellung der optimalen Produktionsbedingungen wurden Supplementation, Temperatur und Sauerstoffeintrag variiert.

#### ***B.2.2.2. Fermentation im mittleren Maßstab***

Die Fermentation von *Streptomycces violaceus* DSM 8286 erfolgte im 20 l-Maßstab bei 27°C für 60 Stunden als Submerskultur. Die Beimpfung erfolgte mit 1 Vol.% einer 72 h-Vorkultur. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Die Belüftung erfolgte mit 0,5 l/min. Nach der Produktionsphase wurde die Kultur durch eine Schenk-Filterpresse mit

einem Seitz-T 1500-Filter geseiht und unter Zugabe von 1 kg Diatomeensand (Celite Hyflo Super CeC) filtriert. Die Bakterienfeuchtmasse wurde verworfen und lediglich das Kulturfiltrat weiterverarbeitet. Zur Entfernung des feinen Detritus wurde das Filtrat über eine Saugflasche und Filterrondelle im Keramikfilter abgesaugt und so für die Säulenchromatographie vorbereitet.

### **B.2.3. Säulenchromatographie**

#### ***B.2.3.1. XAD16-Chromatographie***

Für den ersten Aufreinigungsschritt wurde als Säulenmaterial XAD16 (Amberlite, 800 m<sup>2</sup>/g, 250 Å) verwendet. Das Bettvolumen betrug 1,5 l in einer Säule mit 8 cm Durchmesser. Das gereinigte Kulturfiltrat wurde drei Mal mit einer Flussrate von 150 ml/min über die Säule geleitet. Anschliessend wurde mit 20 Bettvolumen H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gewaschen, bis der Durchfluss klar wurde. Danach erfolgte die Elution mit drei Bettvolumen 70%igem Methanol bei gleicher Flussrate.

#### ***B.2.3.2. Regenerieren von XAD16-Säulenmaterial***

Das Säulenmaterial wurde nach der Verwendung für den erneuten Gebrauch regeneriert. Hierzu wurden nacheinander je fünf Bettvolumen 1 M NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> und MEtOH mit einer Flussrate von 6 l/h über das Material geleitet. Das XAD16-Material wurde bis zum neuen Gebrauch in MEtOH gelagert.

#### ***B.2.3.3. Aufkonzentrierung des Rohprodukts***

Die salmycinhaltige Fraktion aus der XAD16-Chromatographie wurde im Rotationsverdampfer mit Wasserbad bei 50°C aufkonzentriert.

#### ***B.2.3.4. Chromatographie mit LH20-Sepharose***

Zur weiteren Auftrennung des aufkonzentrierten Rohprodukts wurde das synthetische Harz Sephadex LH20 (Molekularsieb, Lauflänge 60 cm, Durchmesser 3,5 cm) verwendet. Es wurden Portionen á 3 ml aufgetragen und mit 20 – 40 % MEtOH eluiert. Mit dem Fraktionssammler wurden 3 ml-Fractionen isoliert und im Anschluss auf Bioaktivität getestet.

#### **B.2.3.5. HPLC**

Die gewonnenen Fraktionen wurden mit der analytischen HPLC (Shimadzu LC10, AT-Pumpen, Duisburg) über reverse Phasenchromatographie (Nucleosil C18, 5 µm, 4x250 mm und Reprosil NH<sub>2</sub> 100, 5 µm 4x250 mm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch) analysiert. Die manuelle Präparation und Prüfung auf Reinheit von Salmycin erfolgte über einem isokratischen Gradienten mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> /Acetonitril (35/65) als Lösungsmittel und einer Flussrate von 1 ml/min. In der Analytik wurde ein Gradient von 100% 2 mM Ammoniumacetat zu 100% Acetonitril mit einer Flussrate von 2 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem UV-VIS-Detektor (Shimadzu, SPD-10AV) bei 220 nm. Die Gesamtlauflänge betrug 20 min.

#### **B.2.3.6. Massenspektrometrie**

Lyophilisiertes Salmycin wurde über GC-MS, Elektrospray-Ionisierungs-MS (Bruker Esquire 3000+; Bruker Daltonics, Bremen gekoppelt mit Agilent 1100 HPLC-System, Agilent, Waldbronn) und FTICR-MS (AMX 600 NMR-Spektrometer) analysiert. Die massenspektrometrische Bestimmung wurde am Institut für Anorganische Chemie, Tübingen vom Gaschromatographie Service Labor von Dr. G. Nicholson durchgeführt. Als Referenz wurde Salmycin B von Hoechst verwendet.

#### **B.2.3.7. Präparation von eisenfreiem Salmycin**

Um eine eisenfreie Form des Salmycins zu erhalten, wurde nach dem Protokoll der Hydroxychinolinmethode von Zähler et al. (1963) verfahren. 4 mg gereinigtes Salmycin wurden in 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und mit 6 mg 8-Hydroxychinolin versetzt. Nach Zugabe von 150 µl MEtOH wurde die Lösung 24 h geschüttelt. Dabei verbleibt das eisenfreie Siderophor im Überstand, während das mit Eisen komplexierte Hydroxychinolin als dunkler Niederschlag ausfällt. Es wurde dreimal mit je 300 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gewaschen und die Überstände gesammelt. Die Überstände wurden durch einen Papierfilter filtriert und dreimal mit 1 ml Chloroform gewaschen, um letzte Hydroxychinolinreste zu entfernen. Die wässrige Phase wurde abgenommen und lyophilisiert. Desferri-Salmycin zeigt keine Färbung mehr und wurde anschliessend in der HPLC analysiert.

## **B.2.4. Bestimmung der Salmycinaktivität**

### **B.2.4.1. Anzucht der Teststämme**

Zur Anzucht der Test- und Laborstämme von *E.coli*, *Enterococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus sp.* für Wachstumsmessungen und zur Untersuchung der Salmycinempfindlichkeit wurde NB-Medium verwendet. Hierfür wurden zunächst ÜNKs von Plattenkulturen angesetzt. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 200 rpm und 37°C im Wasserbadschüttler. Ausnahmen stellen die Teststämme von *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.* und *Yersinia sp.* dar, die bei 28°C inkubiert wurden. *Streptococcus pneumoniae* und andere Streptokokken wurden in THY-Medium ohne Schütteln in 20 ml-Falcon-Tubes mit Schraubdeckeln bei 37°C im Inkubatorschrank angezogen.

Die Haltung der Stämme erfolgte für kurzfristige Versuche auf Agarplatten des entsprechenden Mediums. Die Teststämme wurden nach Inkubation bei 4°C im Kühlschrank gelagert und im vierwöchigen Rhythmus neu überimpft.

Die langfristige Lagerung erfolgte in Glycerolkultur bei -70°C. Hierfür wurden 500 µl einer ÜNK mit 500 µl Glycerol vermischt und in 1 ml-Probengläsern mit Schraubdeckeln tiefgefroren. Teststämme, die den S2-Sicherheitsbestimmungen unterliegen, wurden von der Stammsammlung der Medizinischen Mikrobiologie bezogen, da eine sachgerechte Lagerung als Glycerolkultur nicht möglich war. Mit allen potentiell pathogenen Organismen wurde im Labor unter Sicherheitsstufe 2 gearbeitet (gem. §7 GenTG).

### **B.2.4.2. Plattendiffusionsassay (Gerlach, 1974)**

Die Bestimmung der Sensitivität von Mikroorganismen gegen Salmycin wurde im Agarplattendiffusionstest unter eisenlimitierten Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde Salmycin in wässriger Lösung in den Konzentrationen von 0.05 – 2.0 mg/ml verwendet. Je 10 µl der unterschiedlichen Salmycin-Lösungen wurden auf sterilisierten Filterrondellen pipettiert und kurz angetrocknet, bevor sie auf die Platten aufgelegt wurden. Die Tests wurden dreifach durchgeführt und umfassten Salmycin-konzentrationen von 50 ng bis 20 µg. Die zu untersuchenden Stämme wurden als ÜNK im Reagenzglas mit 2 ml NB-Medium im Schüttler inkubiert. Der Sensitivitätstest

erfolgte anschliessend auf Festmedium mit je 25 ml NBD-Agar. Um eisenlimitierte Bedingungen zu schaffen, wurde den Medien 2´2-Dipyridyl in einer Konzentration von 200 µM, sowie EDDHA (50 µM) zugesetzt. Zur Aufbringung auf das Medium wurden 50 µl der ÜNK mit 3 ml NBD-Topagar vermischt und auf den Platten verteilt. Die Inkubation der Testplatten erfolgte bei 37°C für 16 – 18 h, für die Isolate *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.* und *Yersinia sp.* bei 28°C.

Der Sensitivitätstest für *S. pneumoniae* und andere Streptokokken wurde folgendermassen modifiziert: Die Zellen wurden als ÜNK in THY-Medium angezogen. Anschliessend wurden etwa 70 µl der Kultur mit einem sterilen Q-Tip gleichmässig auf einer Blutagarplatte verteilt. Die Inkubation der Platten mit den Testplättchen erfolgte für 24 h bei 37°C.

### **B.2.4.3. Wachstumsassays**

Die Wachstumstests wurden wie die Sensitivitätstests (B. 2. 4. 2.) unter eisenlimitierten Bedingungen auf Festmedium entsprechend den Bedürfnissen der Teststämme durchgeführt.

Die Siderophore wurden als wässrige Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100 bis 1000 µM) in Volumen von 10 µl auf sterile Filterrondelle pipettiert, getrocknet und auf die Testplatten ausgelegt. Die Auswertung erfolgte nach 16-18 h Inkubation bei 37°C, für *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.* und *Yersinia sp.* bei 28°C.

### **B.2.4.4. Isolierung von Mutanten**

Die Isolierung von spontan resistenten Mutanten erfolgte aus Hemmhöfen von Salmycin- und Albomycinplättchen auf eisenarmem Medium mittels steriler Zahnstocher. Die so gepickten Kolonien wurden vor der Weiterverwendung auf NB-Platten angezogen.

### **B.2.4.5. Bouillon-Mikrodilutionsverfahren**

Das Mikrodilutionsverfahren („Mikroverdünnungsverfahren“) ist das vom Institute of Clinical and Laboratory Standard (CLSI) empfohlene Verfahren zur Feststellung der *in-vitro*-Empfindlichkeit von bakteriellen Erregern. Es wurde als standardisierte Methode von der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ als Richtlinie zur Qualitätssicherung quantitativer labormedizinischer Untersuchungen im Ringversuch übernommen

(Standard M31-A2 [2002], Rosenblatt et al. 1979). Im Kern entspricht es einem auf Mikrotitermaßstab verkleinerten Reihenverdünnungstest. Dadurch verringert sich die Menge an benötigter Testsubstanz. Parallel dazu kann die Zahl der Ansätze erhöht werden.

1. Die Testkulturen wurden auf eine OD<sub>578</sub> 0,5 angezogen und anschliessend mit PBS auf OD<sub>578</sub> 0,1 verdünnt. Die so entstandene Suspension wurde mit Mueller-Hinton-Medium (+ 200 µM Dipyrityl) 1:200 verdünnt.
2. Es wurden 250 µg Salmycin A in 1 ml der Verdünnung gelöst und 200 µl in das erste Well vorgelegt. In die übrigen Wells wurden 100 µl der Bakteriensuspension ohne Salmycin gegeben. Von Well 1 ausgehend wurde nun die 1:10 Verdünnungsreihe pipettiert (s. Tab. B-V).
3. Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37°C und 90 % Luftfeuchtigkeit.
4. Die Zelldichte wurde über einen Zeitraum von 12 h alle 2 h gemessen, dann erneut nach 16 und 20 h. Die MHK wurde nach 16 h Inkubation festgestellt.

**B.2.4.6. Bestimmung der Resistenzhäufigkeit**

Um die Häufigkeit der Resistenzbildung auszuwerten, wurde das Mikrodilutionsverfahren modifiziert: nach 6, 12 und 16 h Inkubationsdauer wurden jeweils 10 µl Ansatz entnommen und eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema angesetzt.

**Tab. B-V** : Pipettierschema für Verdünnungsreihe für Versuche B.2.4.6 und B.2.4.7

Verdünnung	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Ausgangsvolumen	10 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
PBS	990 µl	900 µl	900 µl	900 µl	900 µl

Je 100 µl der Zellsuspensionen wurden auf Selektivplatten ausplattiert und die Resistenten nach 16 h Inkubation ausgezählt. Es wurden stichprobenartig Kolonien gepickt und im Ausstrichverfahren auf Resistenz gegen Salmycin (0,5 mg/ml) geprüft.

#### **B.2.4.7. Bestimmung der Kreuzresistenz**

Um das Verhältnis von Kreuzresistenz zu sonstiger auftretender Resistenz festzustellen, wurden die aus Versuch B. 2. 4. 6. erhaltenen Suspensionen an resistenten Zellen verwendet. Es wurden je 100 µl Suspension (einer auszählbaren Verdünnungsstufe) auf NBD + SAL bzw. NBD + ALB (Konzentration je 0,5 mg/ml) ausplattiert und beide Platten ausgezählt. Das Verhältnis (Albomycin/Salmycin) x100 ergibt den prozentualen Anteil der Häufigkeit einer Kreuzresistenz beider Antibiotika.

#### **B.2.4.8. Bestimmung der Aktivität von aufgenommenen Salmycin in *S. aureus***

Zur Bestimmung der Aktivität von Salmycin, das bereits in die bakterielle Zelle aufgenommen wurde, erfolgte die Inkubation von 2 ml einer *S. aureus* RN6390-Kultur mit 0,5 mg/ml Salmycin über drei Stunden. Die Zellen wurden anschliessend bei 5000x g sedimentiert und dreimal mit 1 ml EDTA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der Ansatz mit Lysostaphin (12 µl einer 1 mg/ml-Stammlösung) für 30 min bei 37°C inkubiert und über Ultraschall aufgeschlossen. Anschliessend erfolgte eine Ultrazentrifugation (1 h bei 100 000x g). Da aufgenommenes Salymcin im Cytosol vermutet wird, wurden je 20 µl des cytosolischen Überstandes auf Plättchen pipettiert und ein Plattendiffusionassay nach Standardbedingungen durchgeführt.

### **B.2.5. Molekularbiologische Methoden**

#### **B.2.5.1. PCR (Saiki et al. 1985 und 1988, Mullis und Falloona, 1987 )**

Seit ihrer Entwicklung hat die PCR zahlreiche Modifikationen erfahren, so dass unterschiedliche Ansätze für verschiedene Zielsetzungen angewandt werden können. In dieser Arbeit wurde zumeist die Standardvariante zur Amplifikation chromosomaler DNA-Fragmente und Plasmid-DNA für die Sequenzierung und anschliessender Untersuchung auf Mutationen sowie zur Klonierung von Genen in Vektoren verwendet. Hierfür müssen kurze flankierende Sequenzabschnitte des gesuchten Bereichs auf der DNA bekannt sein. Diese Oligonukleotide (Primer) werden als Startsequenz für die Synthese des DNA-Abschnitts benötigt.

<u>Standard-Ansatz (50 µl):</u>		<u>Standard-Amplifikation*</u>	
ddH <sub>2</sub> O	34 µl	Denaturierung	98°C - 2 min
Puffer (5x)	10 µl	<u>30 Zyklen:</u>	
dNTP	1, 4 µl	Denaturierung	98°C - 50 s
Primer 1 (100 pmol)	1, 0 µl	Annealing	53°C - 45 s
Primer 2 (100 pmol)	1, 0 µl	Extension	72°C - 60 s
DMSO	1, 0 µl	- Zyklusende -	
Template-DNA	0, 8 µl	Endextension	72°C - 4 min
Phusion-Polymerase	0, 8 µl	Kühlen	5°C bis Ende

\* Die Parameter des Zyklus variieren je nach Template-DNA. Als Faustregel wurden pro 1 kb Fragmentlänge 30 s Extensionszeit + 20% verwendet. Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Qualität der Primer (Ranking durch Netprimer nach GC-Gehalt, Hairpins, T<sub>m</sub> ermittelt) und wurde ggf. den PCR-Ergebnissen angepasst.

#### ***B.2.5.2. Cycle Sequencing & Sequenzierung (Sanger et al., 1977)***

Das Cycle Sequencing stellt eine Sonderform der PCR dar und dient als vorbereitender Schritt für die Sequenzierung. Während der Prozedur wird das eingesetzte Template denaturiert und eine *proofreading*-Polymerase synthetisiert mit den vorhandenen Einzelsträngen neue DNA-Stränge. Zu einem beliebigen Zeitpunkt werden während der Extensionsphase fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut, welche die Synthese stoppen. A, T, C und G sind farblich unterschiedlich markiert. Dadurch entstehen verschieden grosse DNA-Fragmente, die an ihrem 3'-Ende eine spezifische Markierung tragen. Das Cycle Sequencing wurde mit dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten *BigDye durchgeführt*. Im Anschluss an das Cycle Sequencing werden die Produkte über eine Ethanol-fällung aufgereinigt und getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte über den *AbiPrism 373xl* Kapillarsequenzierer. Die gelösten Produkte aus dem Cycle Sequencing werden über polymerbeladene Kapillaren nach ihrer Grösse aufgetrennt. Am Ende der Kapillare werden die ankommenden Fragmente anhand der markierten Nukleotide am 3'-Ende detektiert und die Sequenz des DNA-Abschnitts kann somit errechnet werden.

### ***B.2.5.3. Isolierung von DNA aus Bakterien***

#### ***B.2.5.3.1. Genomische DNA aus S.aureus***

Die Extraktion genomischer DNA aus *S. aureus* erfolgte mittels des *easyDNA Extraction Kit* von INVITROGEN nach einem modifizierten Protokoll. Eine ÜNK des Stammes (3-10 ml in TB-Medium, 37°C, schüttelnd) wurde bei 4000x g für 5 min pelletiert. Danach wurde in 500 µl EDTA-Waschpuffer resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschliessend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert.

Durch Zugabe von 12 µl Lysostaphin (1 mg/ml) und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Inkubation bei 37°C (mehrfaches Invertieren) für 30 min wurde die Gram-positive Zellwand aufgebrochen. Danach erfolgte die Zugabe von 350 µl Lösung A des *easyDNA*-Kits und vortexen. Der Ansatz wurde 10 min lang bei 65°C inkubiert und anschliessend 150 µl Lösung B hinzupipettiert. Durch Vortexen wurde der Inhalt des RG bis zur Homogenität gemischt. Abschliessend wurden 500 µl Chloroform hinzugegeben, erneut gut durchgemischt und im Anschluss für 20 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert.

Hinterher wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues RG überführt, in das 1 ml eiskaltes 100%iges EtOH pipettiert wurde. Nach erneutem Mischen wurde der Ansatz für 1 – 2 h bei -70°C eingefroren (alternativ üN bei -20°C) und danach erneut für 30 min bei Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des EtOH wurde das Pellet mit 500 µl 80% EtOH gewaschen und zum letzten Mal 10 min abzentrifugiert. Abschliessend erfolgte die Trocknung des Pellets und das Lösen der DNA in 50 – 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> (+ 2µl RNaseA-Lösung). Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

#### ***B.2.5.3.2. Plasmid-DNA (aus E. coli)***

Die Plasmid-Extraktion erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und wurde – wie im Folgenden beschrieben - mit dem *E.Z.N.A-Plasmid Miniprep Kit* durchgeführt. Für low-copy-Plasmide (z.B für pBR322 und Derivate) wurde der Kulturmaßstab auf 200 ml erhöht und zur Aufreinigung Midi-Präps verwendet (*MN Nucleobond AX Kit*).

Eine Kolonie der plasmidtragenden Kultur wurde gepickt und in 3 – 10 ml TB-Medium + Selektionsantibiotikum angezogen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttler. Anschliessend wurden die Zellen in 2 ml-Cups für 5 min bei 4000x g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (+ RNase) aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren gut gelöst. Danach wurden 200 µl Lysepuffer addiert und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Durch Zugabe von 280 µl Neutralisationspuffer fielen die Proteine der Zellen aus und wurden durch 8-minütiges Zentrifugieren bei Höchstgeschwindigkeit pelletiert.

Der Überstand wurde in ein Spin-Säulchen übertragen und 1 min lang abzentrifugiert. Die Zugabe von 500 µl Bindepuffer und Wiederholen des Zentrifugationsschrittes fixieren die Plasmid-DNA an der Matrix der Säulchen. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Zuletzt wurden 600 µl Waschpuffer hinzupipettiert und zweimal bei Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Dazwischen musste der Durchfluss entfernt werden, um ein völliges Trocknen der Säule zu erreichen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und bis zum Gebrauch eingefroren.

### ***B.2.5.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren***

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren stellt bei den meisten molekularbiologischen Techniken einen unverzichtbaren Zwischenschritt dar, da Pufferreste und andere Inhaltsstoffe spätere Reaktionen stören oder gänzlich unterbinden können.

#### ***B.2.5.4.1. Aufreinigung von DNA (PCR-Ansätze)***

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde mit dem Qiagen *PCR Purification-Kit* durchgeführt, nachdem festgestellt wurde, dass eine nachfolgende Sequenzierung signifikant bessere Resultate zeigte als bei der Verwendung diverser Kits anderer Hersteller.

Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 1:5 mit Bindepuffer (PB) gemischt und auf ein Zentrifugensäulchen aufgetragen. Bei geschlossenem Deckel wurde für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µl Waschpuffer (PE) auf die Säule pipettiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Durchfluss erneut verworfen und die Säule bei voller Geschwindigkeit (14 000 rpm) für 1 min bei geöffnetem Deckel zentrifugiert um alle Pufferreste zu entfernen. Die Säule wurde auf

ein beschriftetes Cup gesetzt, je nach Menge des PCR-Produkts 30 – 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  hineinpipettiert und für 2 – 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei voller Geschwindigkeit. Bis zu ihrer Verwendung konnte die DNA bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### B.2.5.4.2. Aufreinigung aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde DNA aus Agarose-Gelen aufgereinigt. Hierfür wurde das *NucleoSpin Extract Kit* verwendet.

Die DNA wurde auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten, in ein 2 ml-RG überführt und gewogen. Pro 100 mg wurden 300  $\mu\text{l}$  des Lysepuffers hinzugegeben und etwa 10 min lang bei  $52^\circ\text{C}$  inkubiert, dabei gelegentlich invertiert, bis das Gelstück geschmolzen war. Anschliessend wurde der Ansatz auf ein Spin-Säulchen gegeben und bei 8000 rpm zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und 600  $\mu\text{l}$  Waschpuffer auf die Säule pipettiert. Nach erneutem Zentrifugationsschritt und Verwerfen des Überstandes wurden 300  $\mu\text{l}$  des Waschpuffers hinzupipettiert und für 2 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, so dass das Säulchen vollständig trocken war. Auf ein neues RG gesetzt wurden entsprechend der DNA-Konzentration 10 – 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  auf die Säule gegeben. Optional wurde noch etwa 2-5 min bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert, um eine bessere Elution zu erreichen und abschliessend 1 Minute bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Bis zum Gebrauch wurde die DNA bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### B.2.5.4.3. Ethanol fällung

Für die DNA-Sequenzierung wurden PCR-Produkte des Cycle-Sequencings durch eine Ethanol fällung aufgereinigt. Hierzu wurden je 1  $\mu\text{l}$  3 M NaAC und 25  $\mu\text{l}$  eiskaltes EtOH (100%) in neue RG vorgelegt. Anschliessend wurden die PCR-Produkte in das RG überführt, gevortext und für etwa 30 min tiefgefroren. Danach erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm in der Kühlzentrifuge. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und 125  $\mu\text{l}$  70 % EtOH in die RG pipettiert, bevor wieder für 10 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und bis zur Sequenzierung bei RT aufbewahrt.

### ***B.2.5.5. Transformation***

Für diese Arbeit wurden Bakterien zu unterschiedlichen Zwecken transformiert: Amplifizierung eines neu hergestellten Plasmids, Gewinnung grösserer Mengen an Plasmid-DNA im Mini- bzw. Midi-Präp-Maßstab oder für Bioassay- und Transportversuche.

#### *B.2.5.5.1. Elektroporation (Zimmermann et al., 1979)*

##### Herstellung kompetenter Zellen:

Die Herstellung elektrokompeter Zellen (*E.coli* und *K. pneumoniae*) erfolgte aus einer 20 ml-Kultur (LB-Medium). Diese wurde bis zu einer  $OD_{578}$  0,5 - 0,8 herangezogen. Die Zellen wurden 15 min bei 4 °C und 3500 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Es wurde auf Eis gearbeitet. Anschliessend erfolgten zwei Waschschrirte mit 1 mM MOPS-Puffer/15 % Glycerin. Dabei wurde das Volumen zur Resuspension pro Schritt um jeweils 50 % verringert. Aliquots á 50 µl wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert bzw. bei -80°C eingefroren.

##### Elektroporation:

Die Elektroporation wurde mit dem *GenePulser* von Bio-Rad durchgeführt und Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenspalt verwendet. Hierfür wurde auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium bereitgestellt und die Küvetten auf Eis gekühlt. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde zusammen mit 2 – 2,5 µl Plasmid hineinpipettiert. Die Transformation erfolgte mit den Parametern 25 kV/cm<sup>2</sup>, 25 µF, 200 Ω. Sofort danach wurde 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und im RG für 1 h schüttelnd inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zur Konzentrierung in der Tischzentrifuge sedimentiert (4000 rpm, 3 min) und in etwa 200 µl Medium resuspendiert. 75 – 150 µl der Zellsuspension wurden auf Selektivmedien ausplattiert und üN inkubiert.

#### *B.2.5.5.2. Chemische Transformation (Dagert und Ehrlich, 1979)*

Falls die vorangegangene Methode fehlschlug (z. B. bei zu salzhaltigem Plasmidisolat), wurde auf die chemische Transformation zurückgegriffen. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte auf identische Weise wie zuvor beschrieben, jedoch wurde in steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und Aliquots á 100 µl hergestellt.

Zur chemischen Transformation wurden 8 µl Plasmid-DNA in ein Aliquot pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 2 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschliessend erneut für 15 min auf Eis gelagert. Nach dem Hinzupipettieren von 800 µl SOC-Medium erfolgten die Abläufe identisch zur Elektroporation.

### **B.2.5.6. Klonierung**

Die durch PCR gewonnenen, aufgereinigten DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut und im Verhältnis 4:1 (DNA:Vektor) in Klonierungs- oder Expressionsvektoren kloniert. Als Klonierungsvektor wurde meist pDrive verwendet, der durch seinen TA-Überhang eine rasche und effiziente Klonierung ermöglicht. Ein weiterer Vorteil von pDrive ist die in nachfolgenden Klonierungsschritten Verfügbarkeit zahlreicher Schnittstellen. Andere Vektoren wurden während der letzten 30 min des Verdaus zusätzlich mit 1 µl CIP inkubiert, um eine vorzeitiges Religieren zu verhindern.

Die herkömmliche Ligation wurde mit dem *Rapid Ligation Kit* von Roche unter Verwendung von T7-Polymerase durchgeführt. Wahlweise wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht ligiert.

#### Standard-Verdau:

DNA	15, 0 µl
Enzym 1	1, 5 µl
Enzym 2	1, 5 µl
Puffer	2, 0 µl
(BSA	1, 0 µl)

#### Standard-Ligation:

Vektor	2, 0 µl
DNA-Fragment	8, 0 µl
T7-Polymerase	1, 0 µl
Ligationspuffer	1, 1 µl

### **B.2.5.7 Nachweis von Mutationen**

Um Deletionen oder Insertionen in einer Gensequenz rasch zu identifizieren, wurde das *SURVEYOR Mutation Detection Kit* von EpiCentre verwendet. Hierbei werden die Sequenzen von Wildtyp-Stamm und Mutante amplifiziert, aufgereinigt und nach Prüfung der Konzentration im selben Verhältnis zusammengegeben. Durch Erhitzen werden die Doppelstränge getrennt und beim Abkühlen erneut dimerisiert. Dabei entstehen Heterodimere, welche einen Wildtyp-Strang und einen Mutantenstrang besitzen. Heterodimere werden durch Zugabe einer spezifischen Nuklease aus

Sellerie (Surveyor<sup>®</sup>Nuclease, Oleykowski et al., 1998; Yang et al., 2000) an der Stelle der Mutation geschnitten, so dass die Lage der Mutation durch Gelelektrophorese in etwa bestimmt werden kann. Insbesondere bei langen Gensequenzen kann so die eigentliche Sequenzierung auf einen bestimmten Abschnitt eingeschränkt werden.

**Tab B-VI** : Schema des Hybridisierungsvorgangs und der Nukleasebehandlung

96°C	2 min	hybridisierte DNA	6 µl (~ 200 ng)
96 auf 85 °C	- 2 °C/sec	SURVEYOR <sup>®</sup> Nuclease	1 µl
85 auf 25 °C	- 0,1 °C/sec	20 min Inkubation bei 42°C	
4 °C	bis Ende	Stopmix	0,7 µl
		→ Gelelektrophorese	

### **B.2.6. Transportassays mit radioaktivem <sup>55</sup>Fe**

Die Aufnahme von Substraten durch Transportproteine der äusseren Membran oder der Zellmembran lässt sich durch die radioaktive Markierung dieser Substanzen messen. Für die Messung der Aufnahmerate von Ferrioxamin und Ferrichrom wurde radioaktives <sup>55</sup>Fe verwendet, das für die Komplexbildung in saurem Milieu zusammen mit der eisenfreien Form der Siderophore inkubiert wurde. Die Aufzeichnung von Transportraten über einen definierten Zeitraum ermöglicht zudem Rückschlüsse auf die Auswirkungen von Mutationen in den für die Aufnahme verantwortlichen Proteinen. Die Transportmessungen wurden nach dem von Hantke (1983) veröffentlichten Protokoll durchgeführt.

#### **B.2.6.1. Herstellung der Substrate**

Die Herstellung der radioaktiv markierten Siderophore erfolgte stets kurz vor Beginn der Transporte nach folgendem Schema:

**Tab. B-VIIa.** : Herstellung der mit <sup>55</sup>Fe beladenen Siderophore für Transportmessungen.

<b>Desferri-Ferrichrom</b>	<b>10 mM</b>	1,5 µl	-
<b>Desferrioxamin</b>	<b>10 mM</b>	-	1,5 µl
<b>HCl</b>	<b>200 mM</b>	1,5 µl	1,5 µl
<sup>55</sup> Fe	<b>500 µM</b>	7,5 µl	7,5 µl
<b><sup>55</sup>Fe-Mix Gesamt</b>		<b>10,5 µl</b>	<b>10,5 µl</b>

### **B.2.6.2. Modifikationen für kompetitiven Transportassay**

Für kompetitive Transportassays wurden der hergestellte <sup>55</sup>Fe-Mix durch die Zugabe von Salmycin A bzw. Albomycin modifiziert (s. Tab.B-VIIb.). Radioaktives Siderophor und nichtradioaktives Sideromycin wurden im Verhältnis 1:1,3 eingesetzt.

**Tab. B-VIIb.** : Herstellung <sup>55</sup>Fe-Mix für kompetitiveTransportmessungen.

<sup>55</sup> Fe-Mix		10,5 µl	10,5 µl	10,5 µl
<b>Salmycin A</b>	<b>1 mM</b>	19,5 µl	-	-
<b>Albomycin</b>	<b>1 mM</b>	-	19,5 µl	-
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>		-	-	19,5 µl
<b>Gesamt</b>		<b>30,0 µl</b>	<b>30,0 µl</b>	<b>30,0 µl</b>
<b>Gesamtaktivität</b>		<b>816 kBq</b>	<b>816 kBq</b>	<b>816 kBq</b>

### **B.2.6.3. Anzucht der Teststämme**

Aus 50 µl einer ÜNK wurde der zu testende Bakterienstamm in 3 ml NB+D-Medium auf eine OD<sub>578</sub> 0,6-0,8 angezogen. Anschliessend wurden die Zellen bei 4000 rpm abzentrifugiert und in (M9-Salze + 0,4 % Glucose) resuspendiert. Die Zellen wurden hierin zweimal gewaschen und anschliessend auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 eingestellt. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 300 µl portioniert und für 30 min bei 37°C mit 7,8 µl NTA (10 mM) schüttelnd inkubiert.

### **B.2.6.4. Transportmessung**

Die Transportmessung wurde mit der Zugabe von 3 µl <sup>55</sup>Fe-Mix zu 300 µl Zellen gestartet. Die Radioaktivität in jedem Ansatz betrug somit 81,6 kBq. In Zeitabständen von 5, 10, 15, 20 und 30 min wurden je 50 µl des Ansatzes entnommen und über Nitrocellulosefilter (25 mm Durchmesser, 0,45 µm Porengrösse) filtriert. Die auf dem Filter verbliebenen Zellen wurden zweimal mit 5 ml 0,1 M LiCl gewaschen und der Filter anschliessend in Szintillationsgefässen für 10 min bei 80°C getrocknet. Nach dem Abkühlen der Gefässe auf RT wurden 5 ml Szintillations-Cocktail (Ultima Gold<sup>®</sup>, Perkin-Elmer) hinzugefügt und für weitere 45 min inkubiert.

Die Radioaktivität jeder Probe wurde dann im Szintillationszähler gemessen und aufgezeichnet. Alle anfallenden radioaktiven Abfälle wurden in extra bereitgestellten Gefässen entsorgt.

### **B.2.7. Proteinaufreinigung**

Die Proteine FhuD (*E.coli*) und FhuD2 (*S. aureus*) wurden im Verlauf dieser Arbeit als Fusionsproteine mit His-Tag-Markierung überexprimiert. Das Plasmid pMR20 (Rohrbach, 1995) enthält das *E.coli*-Protein unter Kontrolle eine T7-Promoters und ist IPTG-induzierbar. Das Plasmid pTG5 mit dem *S.aureus*-Protein ist ein Derivat des pBAD/Myc-His-C-Vektors und exprimiert FhuD2<sub>S.aureus</sub> mittels Arabinose-Induktion.

#### **B.2.7.1. Überexpression von Proteinen**

Zur Überexpression wurde das Plasmid in den Stamm *E.coli* BL21 (DE3) transformiert und auf Selektivmedien (Ampicillin) ausplattiert. Eine Kolonie wurde als Vorkultur angezogen (3 ml TY-Medium + Amp). Die Beimpfung der Hauptkultur erfolgte im Verhältnis 1:100 in 250 ml TB-Medium (Schikanekolben, 37°C im Schüttler, Ampicillinselektion). Das Induktionsschema für die verschiedenen Klone wurde folgendermassen gewählt:

**Tab. B-VIII :** Induktionsschema für FhuD-Überexpression in verschiedenen Vektoren

	FhuD <sub><i>E. coli</i></sub>	FhuD2 <sub><i>S. aureus</i></sub>
Induktions-OD <sub>578</sub>	0,6	0,7
Zugabe IPTG (Endkonzentration)	1 mM	-
Zugabe Arabinose	-	0,2 %
Dauer der Überexpression	3 h	2,5 h

Vor und nach der Induktion wurde jeweils 1 ml Zellsuspension zur Erfolgskontrolle gesammelt. Nach der Überexprimierung wurden die Zellen sedimentiert (4000x g bei 4°C für 15 min) und in His-Tag-Lysepuffer resuspendiert (40x konzentriert). Ausserdem wurde eine Kontrolle des Überstandes aufbewahrt. Bis zur Weiterverarbeitung ist das Zellpellet bei -20°C lagerbar.

#### **B. 2.7.2. Zellaufschluss**

Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis mit der French Press. Das gelöste Pellet wurde bei 1500 psi dreimal durch die French Press passiert. Die Sichtkontrolle zeigte eine Änderung der Trübung von undurchsichtig zu opaleszent. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Ultrazentrifugation bei 100000x g bei der die Zelltrümmer pelletiert wurden. Die cytosolischen Proteine befanden sich danach im Überstand.

### **B.2.7.3. His-Tag-Aufreinigung über Ni-NTA-Säulen**

Die Gewinnung der His-Tag-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des *Ni-NTA-Purification Kits* von Qiagen mit Zentrifugensäulchen. Daher entspricht das hier verwendete Protokoll den Herstellerempfehlungen für native Proteine. Hintergrund der His-Tag-Aufreinigung ist das reversible Binden des poly-Histidinrests der Proteine an eine NTA-Matrix. Imidazol verdrängt die Histidine, so dass die Anlegung eines Imidazolgradienten die Gewinnung des aufgereinigten Proteins ermöglicht.

Nach der Äquilibrierung der Spin-Säulchen (600 µl Lysepuffer) wurden zunächst zweimal jeweils 600 µl des Proteingemischs aufgetragen und abzentrifugiert (Tischzentrifuge, max. 2000 rpm, 2 min bei geschlossenem Säulchendeckel, evtl. länger). Im Anschluss erfolgte zweimaliges Waschen mit Waschpuffer. Das Protein wurde in zwei letzten Schritten mit Elutionspuffer (je 200 µl) von der Säule gewaschen. Alle Durchläufe wurden als Kontrollen für die SDS-PAGE gesammelt.

### **B.2.7.4. Proteinbestimmung (BCA-Assay)**

Zur Bestimmung der Menge an Protein wurde der BCA-Assay (Smith et al., 1985) herangezogen. Dieser colorimetrische Nachweis von Protein gründet auf die Biuret-Methode, bei der Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung durch vorhandenes Protein reduziert werden. Die reduzierten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen werden durch die im Ansatz vorhandene Bichinoninsäure (BCA) in einem 1:2-Verhältnis komplexiert, was zu einer Änderung der Adsorption im Wellenlängenbereich 532 nm führt, die nahezu linear verläuft.

Zur Herstellung einer Eichgerade diente ein BSA-Standard. Sowohl *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* als auch der Albumin-Eichstandard wurden von Pierce bezogen.

### **B.2.7.5. Protease-Schutzexperimente (Goldberg, 1972)**

Um festzustellen, welche Substrate von FhuD<sub>E.coli</sub> und FhuD2<sub>S.aureus</sub> erkannt und gebunden werden, wurden Verdauexperimente mit Proteinase K durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob Salmycin von den Bindeproteinen erkannt wird.

Hierfür werden 20 µg Protein mit 5 µg Substrat 30 min bei RT inkubiert, Positiv- und Negativkontrolle wurden mit PBS durchgeführt. Anschliessend wurde 1 µg Proteinase K zugegeben (siehe. Tab. B-IX; Gesamtvolumen des Ansatzes ist 100 µl) und 30 min bei 56°C inkubiert.

**Tab. B-IX :** Pipettierschema für Proteinase-Schutzexperiment.

(in µg)	unverd	verdaut	Fec	Fox	Sal	Alb	Fem
Substrat	(PBS) 5	(PBS) 5	5	5	5	5	5
Protein	20	20	20	20	20	20	20
Prot K	-	1	1	1	1	1	1
PMSF	2	2	2	2	2	2	2

Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 2 µg PMSF und Inkubation für 30 min bei RT gestoppt und im Volumenverhältnis 1:1 mit 20% TCA gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis und einem Zentrifugationschritt (14 000 rpm, 15 min) wurde mit einem identischen Volumen Aceton gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde es in Ladepuffer aufgenommen.

#### ***B.2.7.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)***

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte mit 12%igen Mini-Acrylamidgelen in vertikalen Elektrophoresekammern der Firma BIOMETRA. Die Proteinproben wurden in 5x Laemmli-Puffer gelöst und 5 min bei 96°C denaturiert. Anschliessend wurden 20 µl Probenvolumen in die Geltaschen pipettiert. *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas) wurde als Standardmarker für die Grössenbestimmung der Proteine eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde bei konstanten 12 V durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die Gele 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt, anschliessend mehrfach in Entfärbelösung gewaschen und unter Unterdruck getrocknet.

#### **B.2.8. Bestimmung der Zytotoxizität**

##### ***B.2.8.1. Zellkultur***

Die Haltung der eukaryotischen Zellen erfolgte im separaten Zellkulturlabor. Zur Kontrolle und Auszählung der Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop und einer Neubauer-Zählkammer gearbeitet.

Die Anzucht von HEp2-Zellen wurde in 50 ml-Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> im Zellinkubator. Es wurde DMEM-Medium (+ 10 % FCS, + Antibiotikamix Pen/Strep) verwendet und das Medium alle 48 h gewechselt.

Beim Erreichen einer zu hohen Zelldichte erfolgte ein Splitten der Kultur. Hierfür wurde ein Trypsin-Verdau durchgeführt:

1. Zugabe von 3,5 ml 5 % Trypsin-Lösung und 10 min Inkubation.
2. Hinzufügen von 4,5 ml DMEM-Medium und Abzentrifugation bei 700 rpm und RT.
3. Anschliessend Resuspension in 8 ml frischem DMEM und Verteilung auf neue Kulturflaschen, Endvolumen jeweils 12 ml.

### B.2.8.2. LDH-Assay

Die Zytotoxizität von Salmycin für eukaryotische Zellen wurde mit dem standardisierten LDH-Assay ermittelt. Hierfür wurde der *Cytotoxicity Detection Kit PLUS* von Roche verwendet. Der Test weist durch ein colorimetrisches Verfahren die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) nach. Das Vorhandensein des Enzyms im Überstand lässt auf ein Absterben der Zellen und eine Zerstörung der Zellmembran schliessen. Im Testansatz kann dies nur durch die Einwirkung der Testsubstanz erfolgen. Die freiwerdende LDH katalysiert die Umsetzung von NAD zu NADH+H. NAD wird hierfür in hohem Überschuss zur Verfügung gestellt. Das entstehende NADH+H bewirkt wiederum die Reduktion von gelbem Tetrazolium zu rotem Formazan (siehe Abb. B1). Da der Farbumschlag kontinuierlich verläuft und sich proportional zur freigesetzten LDH verhält, gibt der Test Aufschluss über das Maß der Zellschädigung durch die Testsubstanz.

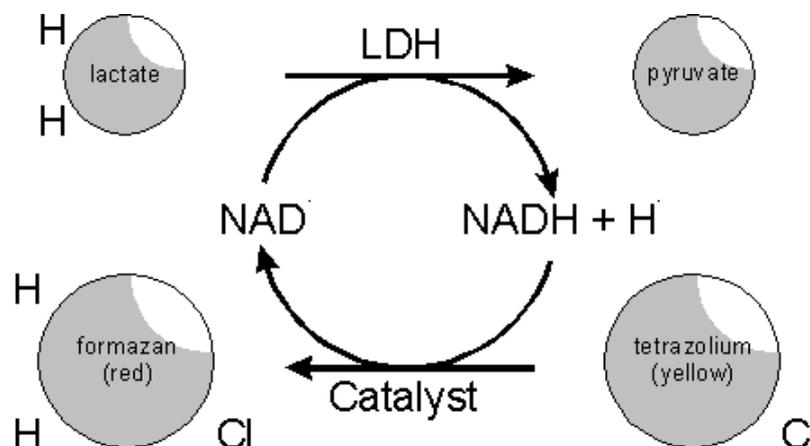


Abb. B1 : Schematische Darstellung des Reaktionsablaufs im LDH-Assay. (Quelle. Internet).

Es wurden HEp2-Zellen (Humanepithelzellen, HeLa-Derivat) verwendet. Diese eukaryotische Zelllinie bildet in Kultur einen einschichtigen Zellrasen und findet aufgrund ihrer relativ einfachen Haltungsbedingungen und biochemischen Eigenschaften seit vielen Jahren Anwendung in der Zellforschung.

Für den LDH-Assay wurden je  $1 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz auf 96-well-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde vor dem Aussäen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### Vorbereitung:

1. Zellen werden wie in B.2.8.1. beschrieben trypsiniert, abzentrifugiert und in neuem DMEM-Medium (+10 % FCS) resuspendiert.
2.  $2 \times 10 \mu\text{l}$  der Zellsuspension werden auf die Zählkammer gegeben und ausgezählt. Aus den beiden Zählungen (je 4 Felder) wird ein Mittelwert errechnet. Dieser Wert entspricht der Anzahl  $X \times 10^4$  Zellen pro 1 ml Suspension.
3. Die Suspension wird auf  $5 \times 10^4$  Zellen/ml verdünnt.
4. Von der erhaltenen Verdünnung werden jeweils  $200 \mu\text{l}$  in die wells pipettiert (=  $1 \times 10^4$  Zellen).
5. Die Zellen werden über Nacht inkubiert, so dass sich ein konfluenter Zellrasen bilden kann.

### B.2.8.2.1. Salmycin-Zytotoxizitäts-Assay

In mehreren Testreihen sollten die kurzfristigen, langfristigen und konzentrations-abhängigen Einflüsse von Salmycin auf die Vitalität eukaryotischer Zellen untersucht werden. Getestet wurden Chargen von Salmycin B (Hoechst) und Salmycin aus Eigenpräparation (HPLC-rein). Die Bestimmung der Zytotoxizität über den LDH-Assay wurde für jede Substanz und Konzentration dreifach durchgeführt. Als Negativkontrolle diente DMEM-Medium, als Positivkontrolle 1 % Triton X-100. Um die Sensitivität der Zellen auf äussere Einflüsse zu prüfen, wurde in einer weiteren Testreihe mittels destillierten Wassers unterschiedlich hoher osmotischer Stress ausgeübt.

### Durchführung:

1. Salmycin wurde für jeden Versuch in verschiedenen Konzentrationen (0,1 – 2 mg/ml) in DMEM-Medium (+ 1 % FCS) gelöst.
2. Die beiden Komponenten des Cytotoxicity Detection Kits PLUS werden schonend aufgetaut und auf Eis so kurz wie möglich vor Versuchsbeginn gemischt (für 100 Tests: 250 µl Komponente 1 zu 11,25 ml Komponente 2).
3. Mit der Abnahme des Mediums von den über Nacht gewachsenen Zellen begann die Versuchsdurchführung.
4. Es wurde 190 µl frisches DMEM (+ 1 % FCS) auf die Zellen pipettiert. Da FCS einen hohen Hintergrund bei der Messung verursacht, wurde der Anteil in diesem Schritt von 10% auf 1% reduziert.
5. Von den Konzentrationen der Testsubstanz wurden je 10 µl in die Ansätze pipettiert.
6. Danach wurden die Zellen für definierte Zeiträume (2 - 16 h) weiter inkubiert.
7. Zum Messzeitpunkt wurden 100 µl des Überstandes – ohne Auf- und Abpipettieren – abgenommen und auf eine neue 96-well-Platte überführt.
8. Es wurden 100 µl der Assay-Mischung hinzugefügt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert.
9. Anschliessend erfolgte die Auswertung bei 490 nm im Platten-Spektrometer.

### **B.2.9. *In-vivo*-Infektionsmodell**

Die *in-vivo*-Wirksamkeit von Salmycin wurde im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden 4 – 6 Wochen alte CD1-Mäuse (Harlan Europe) verwendet. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät genehmigt und am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Als Teststamm wurde der genetisch definierte MRSA-Stamm *S. aureus* COL verwendet, da dieser in den *in-vitro*-Versuchen eine hohe Sensitivität aufwies.

#### **B.2.9.1. *Bestimmung der Infektionsdosis***

Vorbereitend wurde der Stamm *S. aureus* COL einmal durch eine Maus passagiert. Hierdurch wurde der Bakterienstoffwechsel an die Wirtsumgebung angepasst und eine Steigerung der Virulenz des Stammes erreicht. Die zur Auslösung einer Sepsis nötige

Keimzahl wurde anschliessend im Vorversuch bestimmt. Es wurden Keimzahlen von  $10^7$  - $10^9$  Zellen anhand von drei Gruppen (je 4 Tiere) getestet. Die Mäuse wurden beobachtet und nach 72 Stunden getötet. Danach wurde die Lebendkeimzahl im Nieren- und Milzhomogenisat bestimmt.

Die für die Versuchsdurchführung verwendete Keimzahl wurde auf  $10^8$  Zellen festgelegt, da alle Tiere mit einer höheren Dosis innerhalb von 48 h verstarben. Tiere mit der Versuchsdosis wiesen nach drei Tagen einen schlechten Allgemeinzustand auf.

**B.2.9.2. In-vivo Wirksamkeit von Salmycin**

Die *in-vivo* Wirksamkeit von Salmycin wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

**Tab. B-X** : Schema für Infektionsmodell; PBS=phosphatgepufferte Saline, SAL=Salmycin (10 mg/kg Körpergewicht), VAN=Vancomycin (20 mg/kg Körpergewicht), RIF = Rifampicin (10 mg/kg Körpergewicht)

<b>Gruppe</b>	<b>0 h</b>	<b>6 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 bzw. 72 h</b>
1	Infektion	PBS		Töten
2	Infektion	SAL		Töten
3	Infektion	VAN		Töten
4	Infektion	SAL	SAL	Töten
5	Infektion	VAN	VAN	Töten
6	Infektion	VAN + RIF		Töten

Die Antibiotika wurden in einem Volumen von 200 µl verabreicht. Als Negativkontrolle diente PBS. Als Positivkontrollen dienten Vancomycin, sowie eine Kombination aus Vancomycin und Rifampicin. Für die Kontrollantibiotika wurden die klinisch angewandten Konzentrationen zur Behandlung einer MRSA-Sepsis verwendet. Salmycin wurde in den Konzentrationen von 2 mg/kg und 10 mg/kg verabreicht. Die Tiere wurden zunächst 72 Stunden nach Infektion getötet, später wurde die Zeit auf 48 Stunden verkürzt, um die Effektivität von Salmycin hinsichtlich der Keimzahlreduktion exakter zu bestimmen. Nach dem Töten der Tiere wurden Nieren, Milz und/oder Leber entnommen. Die Organe wurden in 5 ml PBS homogenisiert und Verdünnungsreihen auf Vogel-Johnson-Agar ausplattiert. Die Lebendkeimzahl wurde nach 24 Stunden Inkubation ermittelt.

## **B.2.10. *In-silico*-Arbeiten**

### **B.2.10.1. *Phylogenetische Analyse***

Die phylogenetische Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm *ClustalX* nach dem Neighbour-Joining-Modell mit Dayhoff-Matrix. Die Sequenzdaten wurden zuvor in *Bioedit* bearbeitet. Durch das Hilfsprogramm *TreeView* wurden mittels der Analysedaten Stammbäume generiert, die im Anschluss mit Adobe Illustrator weiterbearbeitet wurden. Die Bootstrap-Analyse der Stammbäume mit 1000 Wiederholungen erfolgte mit dem Programm *ClustalX*. Das Neighbour-Joining-Modell (Saitou und Nei, 1987) ist momentan die am meisten verbreitete Methode zur Erstellung von Baumtopologien. Durch die Bildung von Distanzmatrizen mit kleinstmöglichen Entfernungen soll ein Stammbaum mit minimaler Gesamtlänge gebildet werden. Dieses Verfahren soll der Tatsache gerecht werden, dass evolutionäre Schritte, die zur Artbildung führen, ebenfalls durch kleinstmögliche Veränderungen von Gensequenzen stattfinden. Die Qualität der NJ-Analyse hängt stark von der zugrunde liegenden Distanzmatrix ab, in der Mehrfachsubstitutionen von Nukleinsäuren berücksichtigt werden sollen.

Zur statistischen Bewertung von Topologien wird das Bootstrapping (Felsenstein, 1985) verwendet. Die dabei errechnete Signifikanz ergibt sich aus zufälligem Ziehen und Zurücklegen von Nukleotidpositionen des für den Stammbaum erstellten Alignments. Hierbei werden beliebig viele Datensätze generiert, mit denen die Analyse wiederholt wird. Die dabei erhaltenen bootstrap-Werte zeigen an, wie oft bestimmte Gruppen der Topologie wiederholt auftraten. Dies gilt als Maß für die Zuverlässigkeit des erstellten Stammbaums und der dort dargestellten Gruppen.

### **B.2.10.2. *Sequenzalignments***

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm *Finch-TV* bearbeitet. Alignments wurden mit *Bioedit* erstellt.

Der Abgleich mit Sequenzen aus den Datenbanken von *NCBI*, *EMBL* und *SWISSProt* erfolgte mit den dort zur Verfügung stehenden Applikationen zur Online-Analyse. Nähere Informationen sind von dort zu beziehen.

### **B.2.10.3. Statistische Tests**

Zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeiten für die Konsistenz der Daten des Zytotoxizitätstest und der *in-vivo*-Tests wurde der Student'sche T-Test für verbundene Datensätze mit einem Signifikanzniveau  $\alpha=5\%$  gewählt. Dieser statistische Test prüft die Konsistenz zweier Grundgesamtheiten von Daten mittels eines Erwartungswertes. Hierzu werden zwei Hypothesen über den Testausgang ausgestellt:  $H_0$ =zwei Datensätze unterscheiden sich nicht.  $H_1$ =zwei Datensätze unterscheiden sich. Dies dient zur Kontrolle des sog. Fehlers 1. Art, bei dem durch Festlegen eines Signifikanzniveaus mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen wird, dass eine Fehlinterpretation der Ergebnisse (5 % Entscheidungswahrscheinlichkeit für  $H_1$  obwohl  $H_0$  richtig ist) getroffen wird. Im konkreten Fall sollte entschieden werden, ob Salmycin einen zytotoxischen Effekt besitzt oder nicht bzw. ob Salmycin eine signifikante Reduktion der Keimzahl bewirkt oder nicht.

In der Auswertung der *in-vivo*-Versuche wurde als graphische Darstellung der Box-Whisker-Plot (Box-Plot) gewählt, da dieser die für die Fragestellung beste Übersichtlichkeit bietet. Der Box-Plot fasst verschiedene Maße der zentralen Tendenz, Streuung und Schiefe in einem Diagramm zusammen. Alle Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte, werden dargestellt. Es wurde ein Standard-Box-Plot verwendet. Die Box umfasst 50% der Daten. Anhand der Länge der Box und des eingezeichneten Medians lassen sich Streuung und Schiefe der Daten ablesen. Die Länge der Whiskey ist abhängig von den Maximalwerten, beträgt jedoch höchstens den 1,5fachen Wert des zugehörigen Quartils.

## C. Ergebnisse

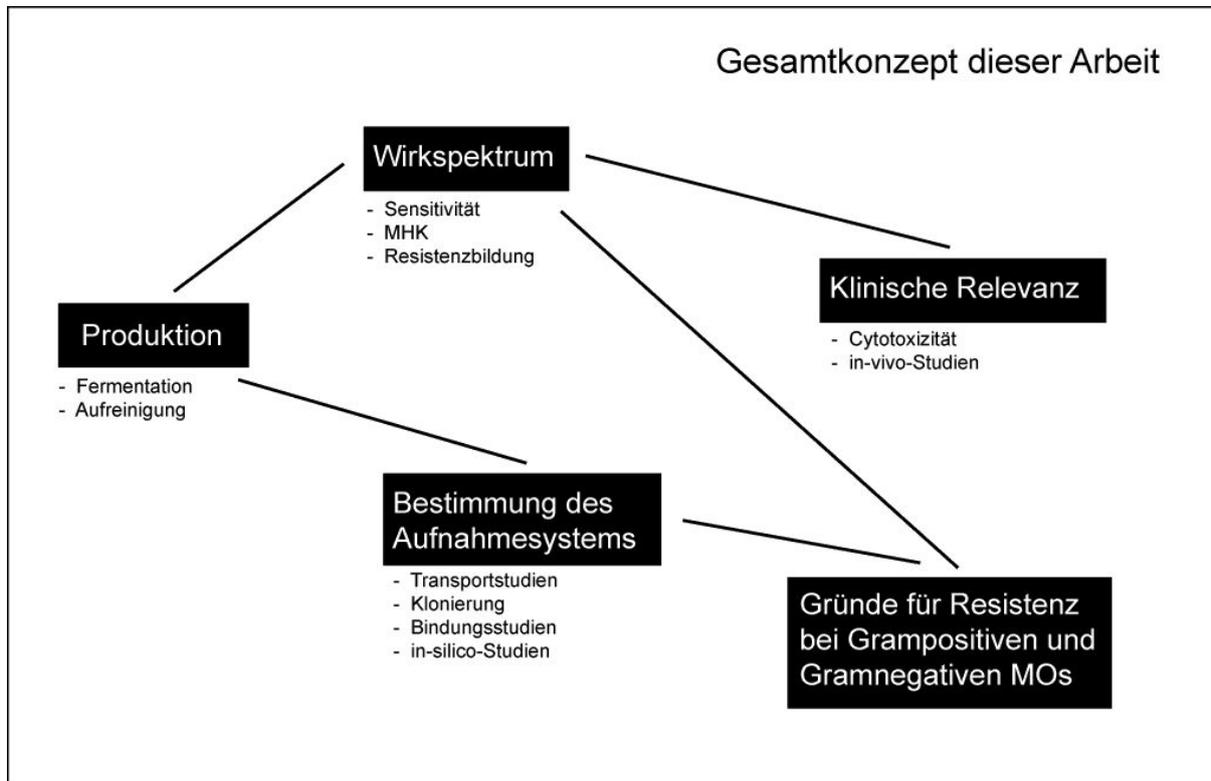


Abb. C1 : Überblick über das Arbeitskonzept.

### C.1. Salmycin – Produktion und Aufreinigung

In der ersten Phase dieser Arbeit wurde eine für die folgenden Versuchsreihen ausreichende Menge an Salmycin produziert und aufgereinigt. Zur Optimierung der Produktionsbedingungen, wurden zuerst die verschiedenen Parameter der Salmycinproduktion untersucht und durch Bestimmung der Bioaktivität nach standardisiertem Verfahren ermittelt.

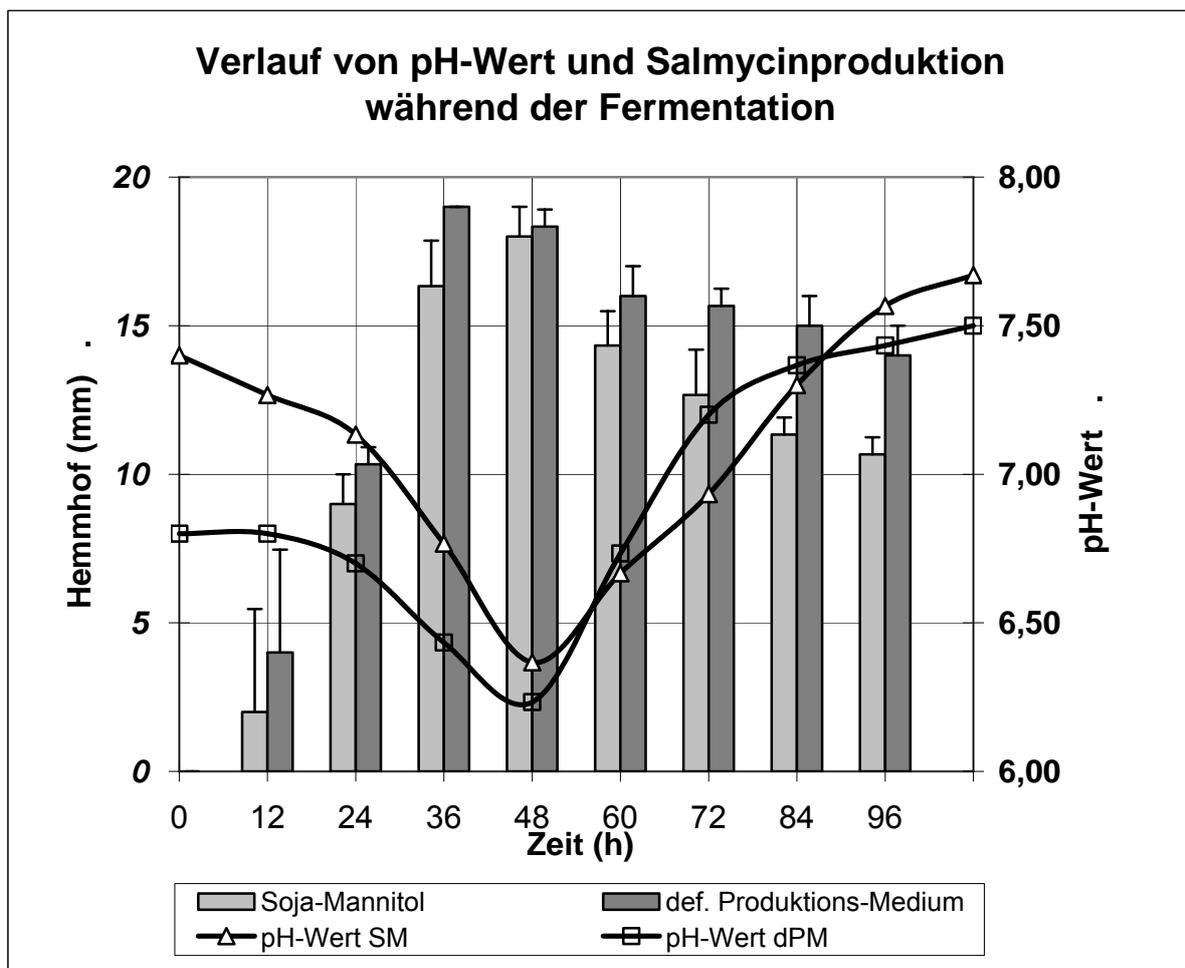
#### C.1.1. Produktionsmedium

Es wurde untersucht, ob ein definiertes Medium zu besseren Ausbeuten führt als das bisher verwendete undefinierte Standardmedium (Sojamehl-Mannitol). Als Basis für ein definiertes Medium bot sich eine bereits für die Albomycinproduktion verwendete Nährstoffzusammensetzung an (siehe. B.1.5.; Fiedler et al., 1985). Tatsächlich zeigte sich im Vergleich beider Medien auf der Seite des definierten Mediums eine bessere Ausbeute (Abb. C2). Die optische Kontrolle beider Ansätze ergab ein differenziertes Bild: während im Soja-Mannitol-Medium eine Antibiotikumproduktion durch eine

Klärung des Mediums und eine rostbraunen Färbung angezeigt wird, blieb das definierte Medium milchig-trüb bei nur sehr geringer Eindunkelung. Die Bildung sphäroider Mycelkörper mit einem Kugeldurchmesser von bis zu einigen Millimetern sowie die Ausbildung einer sporulierenden Kruste im oberen Bereich des Kulturgefäßes und der typische Geruch nach trockenem Waldboden waren weitere Indikatoren einer erfolgreichen Fermentation.

### C.1.1.1. pH-Wert

Während der Salmycinproduktion durch *Strep. violaceus* DSM8286 veränderte sich aufgrund der Sekretion von Stoffwechselprodukten der pH-Wert des Mediums (s. Abb. C2). Dies ging in beiden Medien mit einer geringeren Ausbeute einher, da der niedrige pH-Wert zum einen das Wachstum des Streptomyeten hemmt, zum anderen die Stabilität von Salmycin beeinflusst. Der Verlauf der Salmycinproduktion während der Fermentation zeigte ein Maximum im leicht saueren pH-Bereich zwischen 6,4 und 7,0.



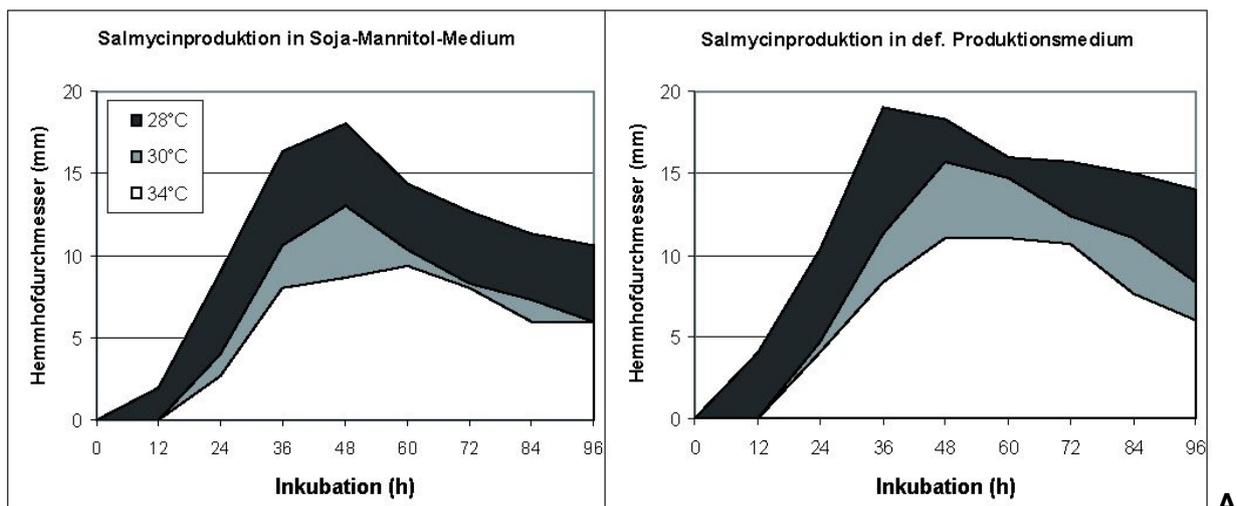
**Abb. C2 :** Übereinandergelagertes Diagramm aus Salmycinproduktion und pH-Wert-Verlauf während einer viertägigen Fermentation in definiertem und undefiniertem Medium (200 ml Volumen in 1-Liter-Schikanekolben, 28°C, 120 rpm, 96 h).

In allen Versuchen wurde ein Produktionsmaximum zwischen 36 und 48 Stunden nach Start der Fermentation gemessen. Die Ausbeute an Salmycin sank nach etwa 60 Stunden deutlich ab, wobei die Abnahme im Sojamannitol-Medium stets schneller voranschritt als im definierten Medium.

### C.1.1.2. Temperatur

Wie der pH-Wert beeinflusst auch die Temperatur das Wachstum und die Produktion. Höhere Temperaturen führten in den Versuchen meist zu Kontaminationen der Ansätze oder „Umkippen“ des Mediums.

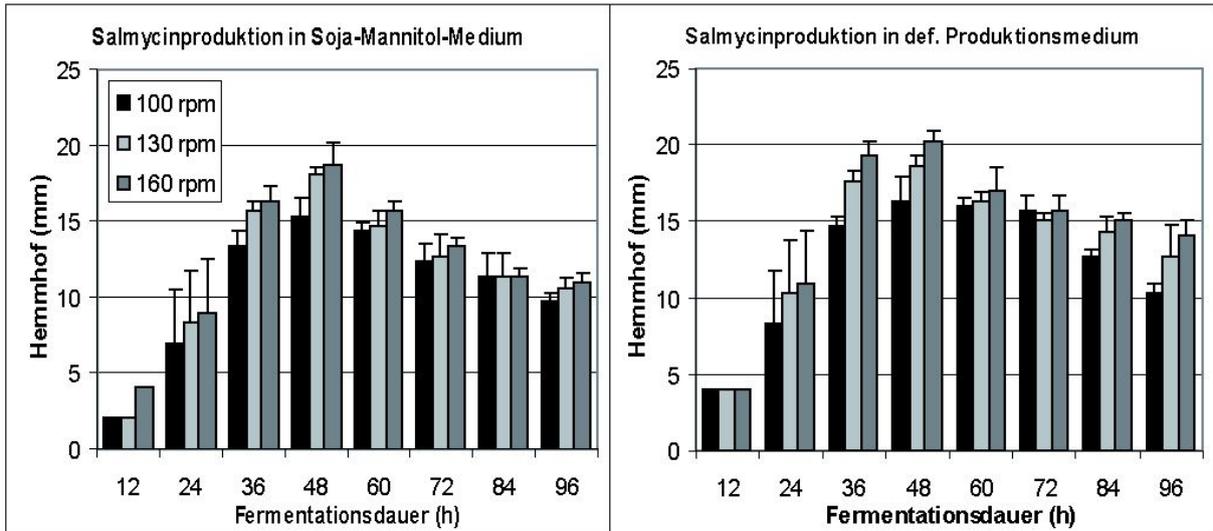
Wie die meisten Streptomyceten weist auch *Strep. violaceus* DSM8286 ein Temperaturoptimum im Bereich von 28°C auf. Dies konnte in Testreihen mit definiertem und undefiniertem Medium bestätigt werden (siehe Abb. C3).



bb. C3 : Darstellung der Salmycinproduktion in Abhängigkeit von der Temperatur während einer viertägigen Inkubation in undefiniertem und definiertem Medium. (200 ml Volumen in 1l-Schikanekolben, 120 rpm, 96 h).

### C.1.1.3. Belüftung

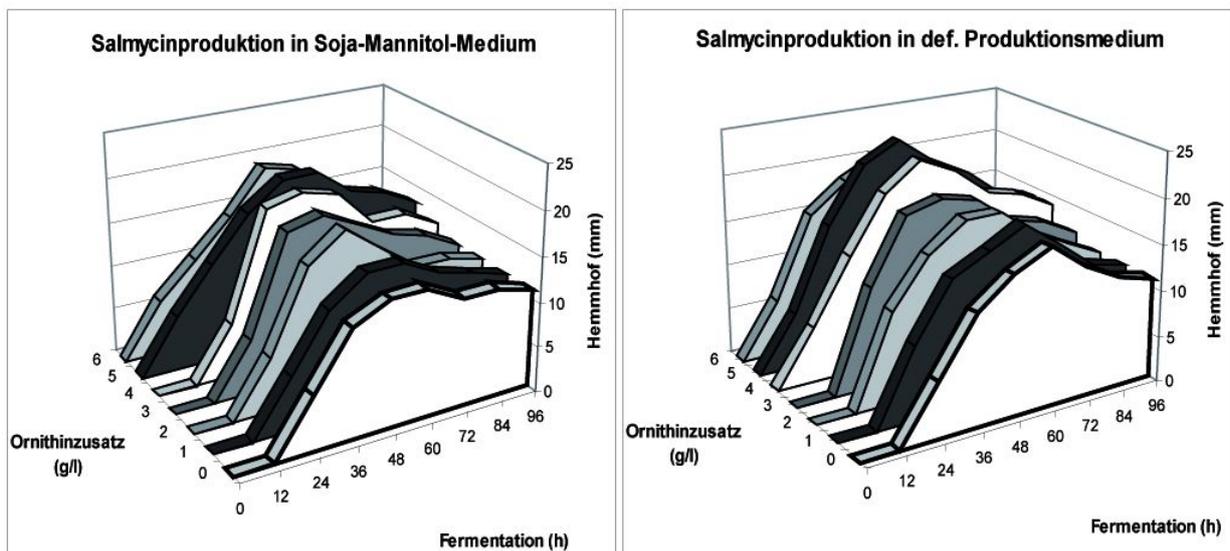
Die Zuführung von Sauerstoff stellt einen wichtigen Faktor bei der Induktion der Salmycinproduktion dar. Die Fermentation wurde daher im temperierten Schüttler mit Rotationszahlen von 100 bis 160 rpm durchgeführt. Es konnte eine geringe Steigerung der Produktionsrate bei höheren rpm beobachtet werden (s. Abb. C4). Die ermittelten Werte hatten lediglich für die Fermentation im kleinen Maßstab eine Relevanz. Für den mittleren Produktionsmaßstab im Fermenter wurde auf Submerskultur mit Rührwerk und 0,5 l/min Lufteintrag zurückgegriffen.



**Abb. C4 :** Darstellung der Salmycinproduktion in Abhängigkeit von der Rotationsfrequenz und damit verbundenem Sauerstoffeintrag während einer viertägigen Inkubation in undefiniertem und definiertem Medium (200 ml Volumen in 1 l-Schikanekolben, 28°C, 96 h).

#### C.1.1.4. Ornithin-Supplementation

Aus Arbeiten über Albomycin war bereits bekannt, dass die Zugabe bestimmter Vorstufen zu einer Steigerung der Antibiotikumproduktion führt. Bei der Siderophorsynthese wird Ornithin für die Ausbildung des Hydroxamatrings verwendet.



**Abb. C5 :** Darstellung der Salmycinproduktion in Abhängigkeit vom Ornithinzusatz während einer viertägigen Inkubation in undefiniertem und definiertem Medium (200 ml in 1l-Schikanekolben, 28°C, 120 rpm, 96 h).

Durch Variierung der Ornithinmenge wurde eine optimale Supplementierung von 4 - 5 g/l Ornithin (30 – 38 mM/l) ermittelt. Die Zugabe dieser Aminosäure führte zu einem rascheren Einsetzen der Antibiotikumproduktion und höherer Ausbeute (s. Abb. C5).

**C.1.1.5. Eisen-Supplementation**

Ob Zusatz von Eisen eine Antibiotikumproduktion zusätzlich fördert, wurde im definierten Produktionsmedium überprüft (siehe Tab C-I). Es konnte festgestellt werden, dass die Salmycinausbeute diskret anstieg, eine eigentliche Produktionssteigerung wurde jedoch erst in Kombination mit Ornithinzufütterung erreicht. Mit zunehmender Eisenkonzentration setzten eine Eindunkelung des Mediums, sowie eine Klärung ein. Die vom Streptomyceten im Submersverfahren typischerweise gebildeten, kugelförmigen Kolonien vergrößerten sich. Die Resultate lassen darauf schliessen, dass Salmycin nur bei ausreichender Versorgung mit Nährstoffen und Eisen synthetisiert wird und keine Antwort auf Mangelbedingungen ist.

Es konnte beobachtet werden, dass die Salmycinproduktion in allen Ansätzen mit Sporenbildung einherging. Eine Eisenlimitierung durch Zusatz von 2,2-Dipyridyl (DPD) verringerte sowohl das Wachstum, die Sporenbildung als auch die Salmycinsynthese.

**Tab. C-I :** Abhängigkeit der Salmycinproduktion von Eisensupplementation (definiertes Produktionsmedium, 200 ml in 1 l-Schikanekolben, 120 rpm, 28 °C, 72 h; Zellmasse % gibt den Volumenanteil von Zellen ausgehend von 1 ml Gesamtansatz nach Ernte in Gewicht -% an).

	DPD (µM)	FeCl <sub>2</sub> (µM)	Ornithin (mM)	Sporenbildung	Zellmasse %	Salmycin-hemmhof (mm)
1	-	-	-	+	~ 40 - 45	14
2	100	-	-	-	~ 40	-
3	500	-	-	-	~ 20	-
4	-	100	-	+	~ 40 - 45	15
5	-	200	-	(+)	~ 50	15
6	-	500	-	+	~ 45 - 50	15,5
7	-	1000	-	+	~ 50	16,5
8	-	500	10	++	~ 50	17
9	-	500	20	++	~ 50	19
10	200	200	-	-	~ 35	-
11	200	500	-	-	~ 40	14

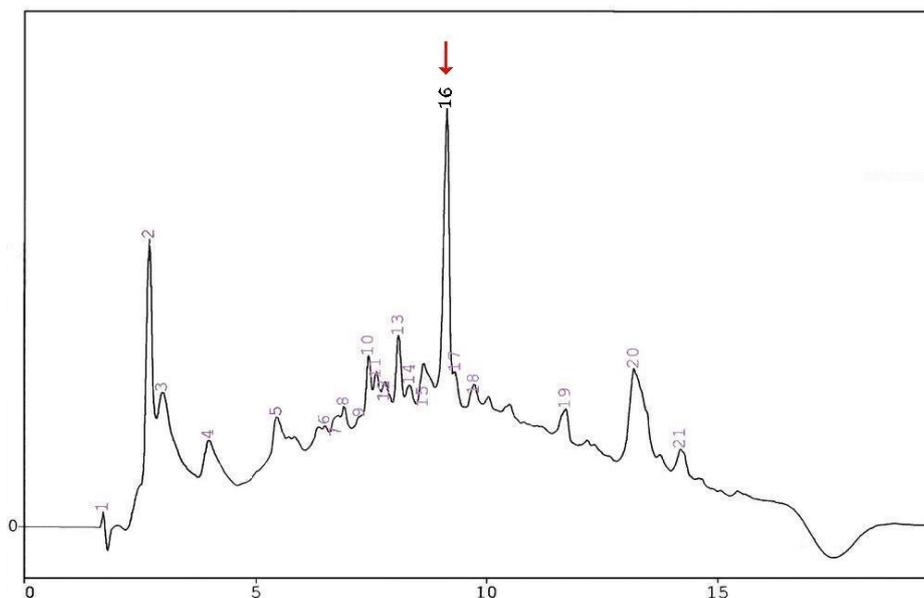
## C.1.2. Produktions- und Aufreinigungsverfahren

### C.1.2.1. Fermentation im 20 l-Maßstab

Nach Fermentationsansätzen im kleinen Volumen (Schikanekolben), wurden die gewonnen Erkenntnisse zur Kultivierung auf einen mittleren Produktionsmaßstab von 20 l übertragen. Verwendet wurde Soja-Mannitol-Medium mit einem Zusatz von 4 g/l Ornithin (30 mM) und pH 7,2. Das Medium wurde mit einer 3 Tage inkubierten Vorkultur beimpft (1:100) und die Fermentation 60 Stunden lang durchgeführt. Nach der Ernte wurde die Kultur über Filterpresse und Papierfilter von Zellmasse und Schwebeteilchen gereinigt. Der Zellkuchen wurde verworfen, da angenommen werden konnte, dass ein Grossteil des Antibiotikums ins Medium sekretiert wurde. Es wurden rund 15 l Kulturbrühe weiterverarbeitet, so dass für die chromatographischen Verfahren ein nahezu klarer, rotbrauner Überstand verwendet werden konnte.

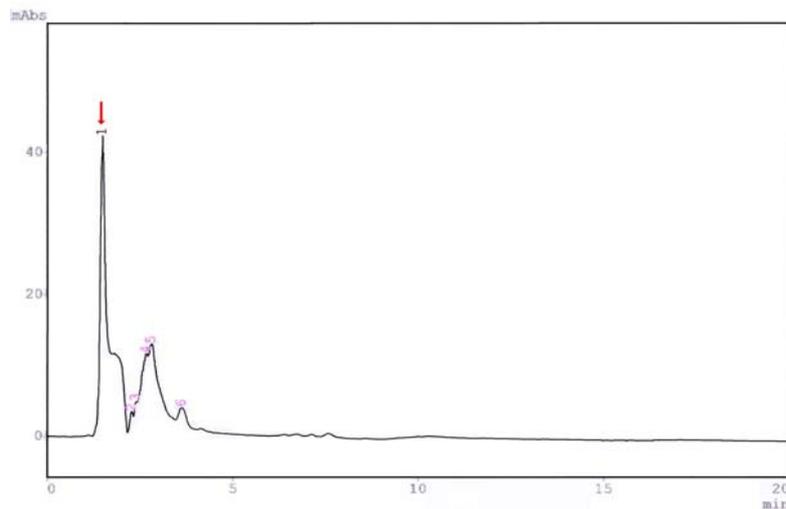
### C.1.2.2. Salmycinaufreinigung über Säulenchromatographie

Der erste chromatographische Aufreinigungsschritt mit XAD16-Säulenmaterial ergab aktive Fraktionen im Gesamtvolumen von 1,0 l (s. Abb. C6). Die salmycinhaltigen Fraktionen traten bei der Elution mit 70% MEtOH nach einem kurzen Vorlauf (0,5 l) als dunkelbraune bis violette Lösung aus der Säule aus. Der Verlauf der Elution liess sich gut anhand der Bildung einer Verlaufsfront verfolgen und das Sammeln der aktiven Fraktion rechtzeitig beenden.

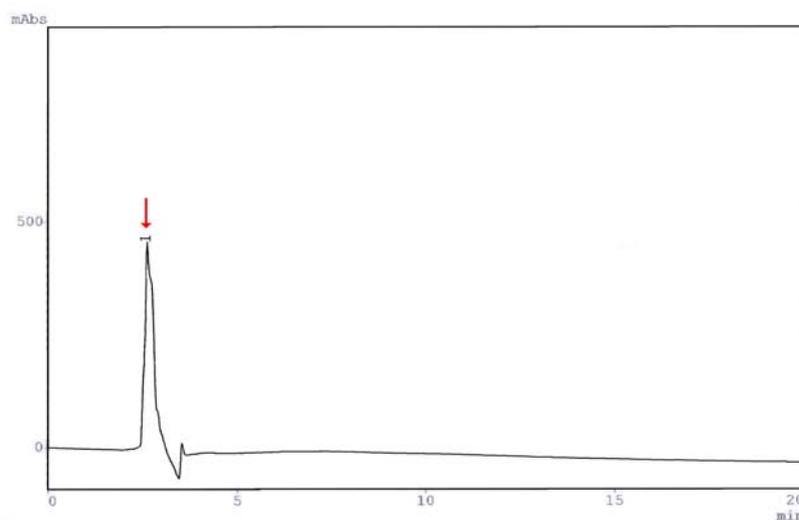


**Abb. C6** : HPLC-Analyse des Rohprodukts nach XAD16-Chromatographie, Peak 16 (Pfeil) entspricht Salmycin (Sephacrose C18-Säule, 20 min, 220 nm).

Die Aufkonzentration der gesammelten Fraktion im Rotationsverdampfer ergab 50 ml Rohprodukt. Es wurde darauf geachtet, die Temperatur des Wasserbads zwischen 40 und 50°C zu halten, um einen Zerfall des Antibiotikums weitgehend zu verhindern. Zur grössenabhängigen Auftrennung der im Rohmaterial enthaltenen Substanzen wurden LH20-Sephadex-Säulen (3,5 cm Durchmesser, 60 cm Lauflänge, 20 – 40% MEtOH) verwendet (s. Abb. C7). Hierfür wurden zunächst Portionen von 2 ml XAD16-Rohprodukt lyophilisiert, in 10 ml MEtOH aufgenommen und in Aliquots á 3 ml aufgetragen, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt, die aktiven Fraktionen erschienen nach etwa 100 ml Vorlauf. Sie wurden auf Bioaktivität getestet, über HPLC analysiert und anschliessend lyophilisiert. Danach wurden die Fraktionen in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und die aktiven Peaks von Dr. Marianne Valdebenito über die HPLC manuell isoliert (s. Abb. C8).



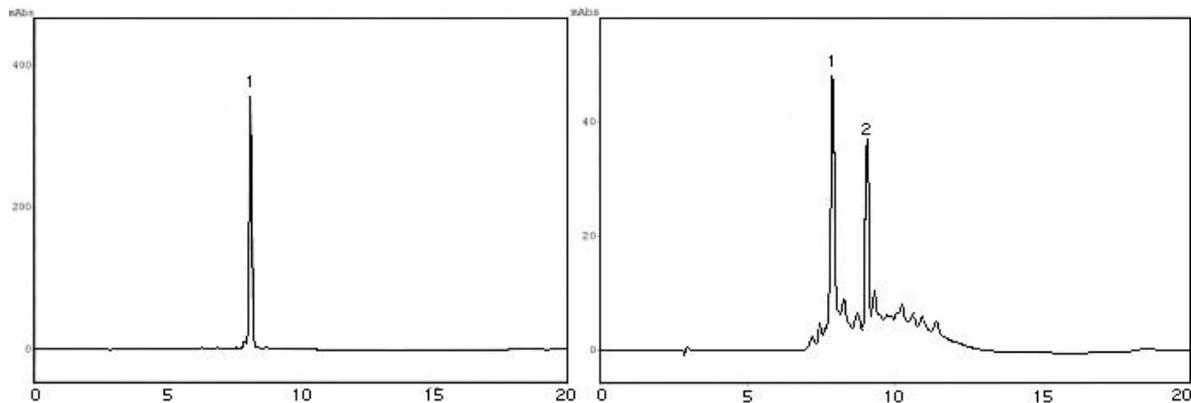
**Abb. C7 :** HPLC-Analyse von Fraktion 24 nach LH20-Chromatographie. Salmycin entspricht Peak 1 (Molekularsieb, Elution mit 20% MEtOH, auf Reprosil NH<sub>2</sub> 100 bei 220 nm detektiert).



**Abb. C8 :** HPLC-Analyse manuell präparierten Salmycins (Reprosil NH<sub>2</sub> 100, 220 nm).

### C.1.2.3. Massenspektrometrie und HPLC

Der Nachweis von Salmycin wurde mittels präparativer HPLC und Massenspektrometrie geführt. In der HPLC-Analyse über C18-Sepharose traten bei Salmycin B von Hoechst zwei Peaks auf, wovon die erste als Ferrioxamin (nach 8,3 – 8,5 min) identifiziert wurde. Der zweite Peak nach 9,3 min entspricht Salmycin (siehe Abb. C9). Anhand der Analyse wurde der Salmycingehalt dieser Probe auf 40 – 45 % geschätzt.



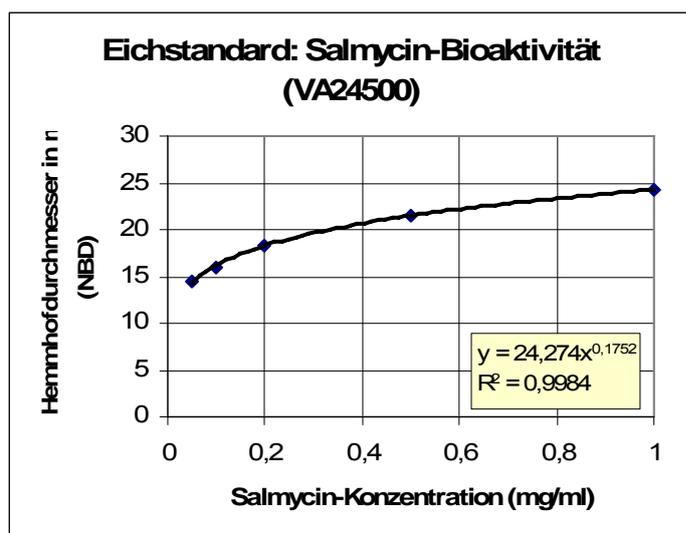
**Abb. C9** : Ferrioxamin B (links) und Salmycin B (Hoechst-Probe; rechts) in einer Sepharose C18-Säule bei 220 nm detektiert.

Im weiteren Verlauf wurde eine Reprosil NH<sub>2</sub> 100 – Säule verwendet, da diese spezifisch Zuckerreste bindet. Salmycin tritt dort als einzelner Peak bei 1,6 – 1,7 Minuten auf. Die Analyse der isolierten Fraktionen in der Massenspektrometrie ergab Peaks im Molekulargewichts-Bereich von 1028 (Salmycin C: 1024,4), 1038 (Salmycin B: 1038,3) und 1060 (Salmycin D: 1053) MW, welche sich mit dem Molekulargewichten der verschiedenen Salmycin-Derivate decken (Vértesy et al., 1995). Weitere Peaks traten im Bereich 614 bis 637 auf, was dem Gewicht des Danoxamins entspricht.

### C.1.2.4. Aufreinigungserfolg

Die Salmycinausbeute wurde anhand von Hemmhofdurchmessern errechnet. Hierzu wurde die Aktivität der Verdünnungen der Kulturüberstände ausgewertet. Die ermittelte Salmycinausbeute war im definierten Medium rund 66% höher als im Soja-Mannitol-Mediums. In den weiteren Aufarbeitungsschritten gingen jedoch grosse Teile des Rohprodukts verloren. So wurde durch XAD-Aufreinigung gegenüber dem Kulturüberstand eine Anreicherung der aktiven Substanz um den Faktor 2,8 – 2,9 erreicht. Nach dem Molekularsieb konnten allerdings nur noch etwa 10 % der ursprünglichen Menge zurückgewonnen werden (siehe Abb. C10). Aus 15 l

Kulturüberstand konnten nach XAD16-Chromatografie 1,13 g Rohprodukt isoliert werden, das durch LH20-Reinigung auf 199,6 mg reduziert wurde. Hieraus wurden über HPLC (Reprosil) 40 mg reines Salmycin isoliert. Die Abbildung C13 liefert hierzu eine Gesamtübersicht. Es wird vermutet, dass grosse Teile der aktiven Substanz durch das Einrotieren bei 50°C zerstört oder durch Lösen in MEtOH/H<sub>2</sub>O-Laufmittel hydrolysiert wurden.



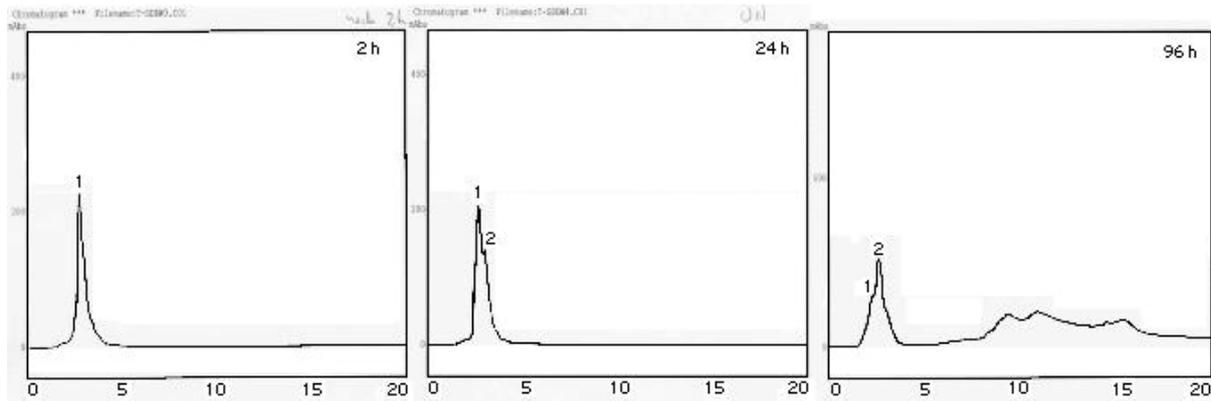
	Ø (mm)	Konz.(mg/l)
<b>Soja-Mannitol</b>		
Überstand	19,3	270
Nach XAD	23,3	792
Nach LH20	15,5	77,3
<b>Definiertes Medium</b>		
Überstand	21,1	449,9
Nach XAD	25,3	1266,5
Nach LH20	16,9	126,6

**Abb. C10** : Bestimmung der Salmycin-konzentration; Kurvengleichung und Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ )

Tabelle oben: gemessene Hemmhofdurchmesser und errechnete Konzentration.

#### C.1.2.5. Isoliertes Salmycin hydrolysiert rasch

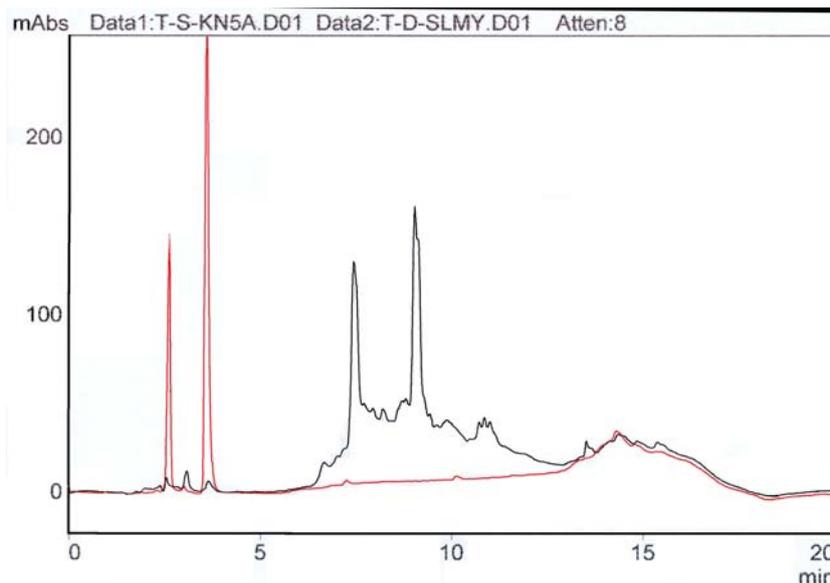
Für die präparative Isolierung von Salmycin wurde eine Reprosil 100 NH<sub>2</sub>-Säule verwendet. Diese stationäre Phase bindet Zuckerreste und sollte gegenüber der C18-Sepharose eine erhöhte Trennschärfe besitzen. Das isolierte Salmycin wurde lyophilisiert und für Bioaktivitätstest in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst. Hierbei wurde festgestellt, dass die Substanz sehr viel rascher hydrolysierte als die von Hoechst erhaltene Probe. Der pH-Wert einer Salmycin-Lösung (1 mg/ml) lag bei Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> bei  $7,0 \pm 0,1$ , in PBS bei  $7,2 \pm 0,1$  (Universal-Indikatorstreifen). Während die Bioaktivität bei sofortiger Verwendung deutlich sichtbar war, wies eine vier Tage alte Salmycinlösung keine Aktivität mehr auf (siehe Abb. C11). Wahrscheinlichster Grund für den raschen Zerfall des selbst hergestellten Salmycins ist eine Fehlbehandlung während der Aufreinigung, wie das Einrotieren bei zu hoher Temperatur oder Verwendung eines falschen pH-Wertes. Da die genaue Ursache nicht geklärt werden konnte, wurde entschieden, das eigenpräparierte Salmycin nur zur Eingrenzung des Wirkspektrums, sowie zur Mutantenselektion und im Zytotoxizitäts-Assay als Vergleichssubstanz zur Salmycin-Charge von Hoechst zu verwenden.



**Abb. C11 :** Spontane Hydrolyse einer Salmycin-Lösung (0,1 mg/ml, pH 7,0). Analyse mit Shimadzu-HPLC mit Reprosil 100 NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>/ACN (35/65) bei 220 nm, Volumen 20 µl.

### **C.1.2.6. Salmycin zerfällt bei der Entfernung des Eisenatoms**

Um die Aufnahme von Salmycin in die bakterielle Zelle mittels radioaktiver Substrate zu messen, wurde in Vorversuchen das Sideromycin entsprechend der Vorgehensweise bei Ferrioxamin B mittels Hydroxychinolin von Eisen befreit. Das Verfahren führte stets zu einem Zerfall des Sideromycins (siehe Abb. C12) und Verlust jeglicher antibiotischer Aktivität. Der gleiche Effekt tritt verlangsamt auf, wenn Salmycin mit Chelex-Harz behandelt wird (Daten nicht gezeigt). Eine erneute Beladung mit Eisen und „Reaktivierung“ des Salmycins durch Inkubation mit FeCl<sub>3</sub> (fünffacher Überschuss) wurde nicht erreicht.



**Abb. C12 :** Abbau von Salmycin B durch Behandlung mit Hydroxychinolin zum Entfernen des Eisens aus dem Hydroxamatring. Salmycin-Kontrolle vor (schwarz) und nach Hydroxychinolinbehandlung (rot); Analyse mit C18-Sepharose-Säule bei 220 nm detektiert.

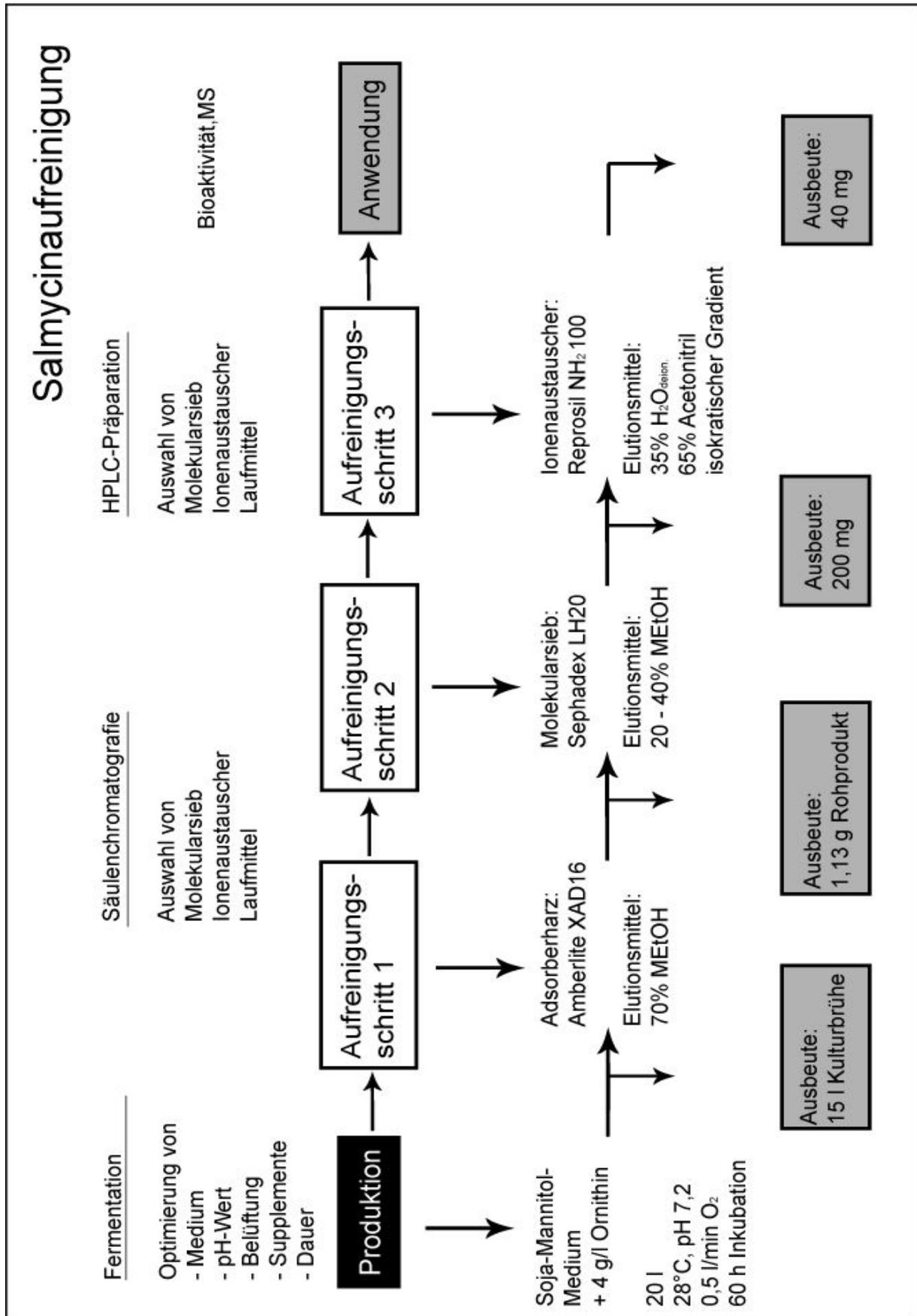


Abb. C13 : Schema zur durchgeführten Salmycinaufreinigung, verwendete Techniken und Parameter, sowie Ausbeute nach jedem Reinigungsschritt.

## C.2. Wirkspektrum

Das Wirkspektrum von Salmycin wurde über den standardisierten Plattendiffusions-Assay unter Eisenmangelbedingungen ermittelt. Als optimal für eine visuelle Auswertung des Wachstums der meisten Teststämme erwies sich eine Kombination der Eisenchelatoren 2'-2 Dipyridyl (200 µM) und EDDHA (50 µM). Die Tests wurden dreifach durchgeführt und der Hemmhofdurchmesser gemittelt.

Um die Anwendungsmöglichkeit von Salmycin gegenüber Problemkeimen zu ermitteln, wurden anfänglich lediglich Klinikisolate getestet. Im weiteren Verlauf war es notwendig, das Erregerspektrum um Stämme aus verschiedenen Stammsammlungen zu erweitern, da bestimmte Keime nicht als Patientenisolat verfügbar waren. Die Verwendung von Laborstämmen lieferte ein umfassenderes Bild über die Verteilung der Salmycinaufnahme und –empfindlichkeit bei relevanten Bakterienarten.

### C.2.1. Salmycinempfindlichkeit Gram-positiver Bakterien

Von den untersuchten Klinikisolaten erwies sich *Staphylococcus aureus* stets als sehr empfindlich, sämtliche *S. epidermidis*-Isolate jedoch als resistent. Alle getesteten Stämme von *Streptococcus pneumoniae* und *S. agalactiae* wiesen eine deutliche Sensitivität auf, nicht dagegen *Streptococcus pyogenes* sowie die nah verwandten Erreger *Enterococcus faecium* und *E. faecalis*. Resistent zeigten sich ausserdem alle Isolate von *Listeria monocytogenes* (siehe Tab. C-II).

**Tab. C-II** : Getestete Klinikisolate Gram-positiver Erreger (10 µg Salmycin B, dreifach bestimmt; bezogen aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen).

Name (Anzahl getesteter Stämme)	Salmycinempfindlichkeit
<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (8)	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ( 5 )	+
<i>Streptococcus agalactiae</i> ( 2 )	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> ( 3 )	-
<i>Enterococcus faecium</i> ( 3 )	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ( 3 )	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ( 2 )	-

Um die Aktivität von Salmycin detaillierter erfassen zu können, wurden nach demselben Verfahren Laborstämme weiterer Arten aus der Gruppe *Staphylococcus*, sowie *Bacillus subtilis* getestet (siehe Tabelle C-III).

**Tab. C-III** : Sonstige definierte Stämme aus der Gruppe Gram-positiver Bakterien (10 µg Salmycin B, dreifach bestimmt; Herkunft: <sup>1)</sup> AG Götz <sup>2)</sup> AG Fiedler <sup>3)</sup> dieses Institut).

<b>Stammnr.</b>	<b>Name</b>	<b>Salmycin-Sensitivität</b>	<b>Wachstumsförderung</b>
RN6390 <sup>1)</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-
COL <sup>1)</sup>	<i>Staph. aureus</i>	+	-
DSM 20501T <sup>1)</sup>	<i>Staph. carnosus carnosus</i>	+	-
DSM 11676T <sup>1)</sup>	<i>Staph. carnosus utilis</i>	+	ja
DSM 20322T <sup>1)</sup>	<i>Staph. simulans</i>	+	-
CCM 2737T <sup>1)</sup>	<i>Staph. haemolyticus</i>	+	(ja)
DSM 7373T <sup>1)</sup>	<i>Staph. piscifermentas</i>	+	-
ATTC14990T <sup>1)</sup>	<i>Staph. epidermidis</i>	-	-
168 <sup>3)</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
SPA2 <sup>3)</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
SPA4 <sup>3)</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
SPF6 <sup>3)</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
AK384 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces sp.</i>	+	-
M145 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-	-
LU10099 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces annulatus</i>	-	-
AK671 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces nobilis</i>	-	-
Tü23 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces. lividans</i>	-	-
Acta1928 <sup>2)</sup>	<i>Streptomyces. acidophilus</i>	-	-

Die bei Gram-positiven Stämmen durch Salmycin verursachten Hemmzonen zeigten unterschiedliche Qualitäten. *S. aureus* und *S. carnosus* wiesen klare Höfe mit scharfen Rändern auf. Die Zonen von *S. simulans* und *S. piscifermentas* waren unscharf gerändert, der Hemmhof von *S. hemolyticus* unscharf und milchig. Sowohl bei Staphylokokken als auch bei Streptokokken waren zahlreiche resistente Kolonien zu beobachten, wie man sie auch in Hemmhöfen von Albomycin findet. Lediglich die Hemmhöfe von *S. carnosus* wiesen keine Resistenten auf. Die Ursache hierfür wurde nicht näher untersucht. Die resistenten Kolonien von *S. aureus* wurden in

nachfolgenden Versuchen ausgewertet. Das Patientenisolat VA24500 wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität für die Salmycinaufreinigung als Teststamm verwendet.

Die Ergebnisse der Tests Gram-positiver Bakterien liessen einen ersten Schluss dahingehend zu, dass deren Salmycinempfindlichkeit in direktem Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines spezifischen Ferrioxamintransportsystems steht.

### C.2.2. Aktivität gegen Actinomyceten

Im Rahmen der Eingrenzung des Aktivitätsspektrums von Salmycin war auch die Wirksamkeit des Sideromycins gegenüber verwandten Spezies des Produzentenstammes mit ähnlicher ökologischer Verbreitung interessant. Die verwendeten Stämme der Stammsammlung AG Fiedler stellen typische Vertreter des Waldboden-Ökotops dar (siehe Tab. C-III). Der Plattendiffusionstest wurde aufgrund des langsamen Wachstums der Streptomycceten modifiziert (siehe Abb. C14).



**Abb. C14** : Streptomycceten im Sensitivitätstest. (100 µl Sporensuspension in 3 ml 1% Wasser-Top-Agar + 100 µM DPD auf HA-Medium, 72 h Inkubation bei 30°C, n=3).

Von links: *Streptomycces spec.* AK384, *Strep. nobilis* AK671, *Strep. annulatus* LU10099.

Aufgelegte Substanzen (je 10 µg): Ferrichrom (oben links), Ferrioxamin B (oben rechts), Albomycin (unten links), Salmycin A (unten rechts). Langsames Wachstum der Streptomycceten und Übergang in die Sporulationsphase erschweren die Dokumentation.

Im Bioassay wurden sowohl die Ferrichrom- als auch Ferrioxaminaufnahme überprüft. Eine Sensitivität gegen Salmycin zeigte lediglich der nicht näher charakterisierte Stamm *Streptomycces spec.* AK384. Die beiden Isolate AK671 und LU10099 waren gegen Albomycin empfindlich, wobei die Hemmzonen nach Übergang in die Sporulationsphase kontinuierlich überwachsen wurden. Die übrigen Teststämme wiesen ein gleichmässiges Wachstum und eine reguläre Sporulationsphase auf. Eindeutige Hemm- oder Wachstumszonen wurden nicht beobachtet.

### C.2.3. Aktivität gegen *Enterobacteriaceae* und andere Gram-negative Bakterien

Alle aus Patienten isolierten Wildtypstämme Gram-negativer Spezies zeigten eine Salmycinresistenz (s. Tab. C-IV). Gelegentlich konnten im Bioassay trübe Hemmhöfe von unter 10 mm Durchmesser beobachtet werden. Diese geringfügige Empfindlichkeit trat lediglich sporadisch und gestreut auf und floss aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit bei der Dreifachbestimmung nicht in die Wertung ein.

Die gefundene Sensitivität Gram-negativer Bakterien gegen Salmycin konnte ausschliesslich an Laborstämmen festgestellt werden, die der institutseigenen Stammsammlung entnommen wurden. Ihre Zuordnung wurde mittels Enterotube<sup>®</sup> nochmals verifiziert.

**Tab. C-IV** : Salmycinempfindlichkeit von Patientenisolaten aus der Gruppe Gram-negativer Pathogene (Sensitivitätstest mit 10 µg Salmycin B, dreifach bestimmt; bezogen aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen).

Name	Salmycinsensitivität
<i>Escherichia coli</i> ( 4 )	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ( 2 )	-
<i>Salmonella heidelberg</i> ( 1 )	-
<i>Shigella sonnei</i> ( 1 )	-
<i>Shigella dysenteriae</i> ( 2 )	-
<i>Shigella flexneri</i> ( 2 )	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ( 3 )	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ( 5 )	- / (+)
<i>Klebsiella aerogenes</i> ( 1 )	-
<i>Serratia marcescens</i> ( 3 )	-
<i>Serratia liquefaciens</i> ( 3 )	-
<i>Morganella morganii</i> ( 2 )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( 3 )	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ( 3 )	-
<i>Proteus vulgaris</i> ( 2 )	-
<i>Proteus mirabilis</i> ( 3 )	-

**Tab. C-V** : Andere getestete Gram-negative Spezies aus der Stammsammlung des Instituts (Sensitivitätstest mit 10 µg Salmycin B pro Filterplättchen, n=3).

Stammnr.	Name	Salmycin-Sensitivität	Wachstum um SAL-Filterplättchen
(LS)	<i>Escherichia coli</i> MS172	-	-
(LS)	<i>Escherichia coli</i> DH5α	-	-
(LS)	<i>Escherichia coli</i> K12	-	-
0294	<i>Escherichia coli</i>	-	ja
0361	<i>Citrobacter freundii</i>	+	ja
5046	<i>Hafnia alvei</i>	+	-
3058	<i>Pseudomonas syringae</i>	(+)	ja
1084	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(+)	ja
5036	<i>Erwinia herbicola</i>	-	ja
1215	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-
5047	<i>Salmonella stanleyville</i>	-	ja
5498	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	ja
2783	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
0607	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	ja
2164	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-
1101/1102	<i>Yersinia enterocolitica</i>	(+)/+	ja
5078	<i>Yersinia mollaretii</i>	-	-

Im Laufe der Untersuchung zum Aktivitätsspektrums von Salmycin konnten mehrere Spezies aus der Gruppe Gram-negativer Bakterien als potentiell Salmycin-empfindlich identifiziert werden: *Hafnia alvei* und *Klebsiella pneumoniae* zeigten klare Hemmzonen mit scharfem Rand. Bei einer Standardkonzentration von 10 µg Salmycin B zeichnete sich *H. alvei* durch einen aussergewöhnlich grossen (31 mm) Hemmhof aus. In den Hemmzonen von *K. pneumoniae* fanden sich, wie auch bei Gram-positiven Isolaten, zahlreiche resistente Kolonien. Drei Arten wiesen einen trüben Hemmhof auf: *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas syringae*, sowie *Citrobacter freundii*. Die anfänglich deutliche Hemmzone wurde bei diesen Spezies kontinuierlich überwachsen, so dass nach 18 h Inkubationszeit ein unterschiedlich dichter Bakterienrasen zu beobachten ist. Andere Teststämme zeigten eine Ringzone um die Salmycin-Plättchen („Kokarde-Effekt“). Hierbei findet ein vom Salmycinplättchen

ausgehendes Wachstum statt. Dies war der Fall bei *Enterobacter cloacae* (0607) sowie bei *Ps. fluorescens* (1084).

Drei weitere *Ps. fluorescens*-Isolate zeigten hingegen keine Sensitivität gegen das Antibiotikum. Der Stamm *Yersinia enterocolitica* (1102) zeigte ebenfalls den Kokarde-Effekt, während der zweite Laborstamm (1101) einen klaren Hemmhof mit trüber Aussenzone aufwies. Nahe verwandte Spezies wie *E. aerogenes* oder *Y. mollaretii* erwiesen sich als resistent (siehe Tab. C-V). Wachstumszonen um die aufgelegten Salmycin-Plättchen zeigten die Nutzung des Sideromycins oder dessen Abbauprodukte als Eisenquelle. Das Patientenisolat *E. coli* 294 (EHEC) wies einen auffallend deutlichen Hof auf. Auch bei anderen *Enterobacteriaceae* wurde ein durch Salmycin verstärktes Wachstum beobachtet (siehe Tab. C-V).

#### **C.2.4. Wirksamkeit gegen eukaryotische Pathogene**

Da Siderophoraufnahmesysteme auch von *Candida albicans* bekannt sind (Hu et al., 2002), wurden auch drei eukaryotische Pathogene auf Sensitivität gegenüber Salmycin getestet: die Hefe *C. albicans* (Stämme SC5341 und G2) und der Fadenpilz *Aspergillus niger* P+, ein fakultativer Erreger der Aspergillose. Alle drei getesteten Stämme erwiesen sich jedoch bei Konzentrationen von 0,05 bis 2,0 mg/ml Salmycin als resistent.

### **C.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Nach der Identifizierung sensitiver Mikroorganismen im Plattendiffusionstest wurden für diese spezifische Hemmkonzentrationen von Salmycin A ermittelt werden. Aus der Gruppe der Enterobakterien wurden *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* verwendet. Aufgrund seiner konstant hohen Sensitivität und Relevanz als nosokomialer Keim stellte *Staphylococcus aureus* aus der Gruppe Gram-positiver Bakterien einen Fokus dieser Arbeit dar.

### C.3.1. Modifikation des Mikroverdünnungsverfahrens

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Salmycin erwies sich das Mikroverdünnungsverfahren mit Testvolumen von 100 µl in 96-well-Platten als geeignete Methode. Die Mikrotiterplatten wurden mit aufliegendem Deckel bei 100% Luftfeuchtigkeit und 35°C inkubiert. Alle zwei Stunden wurden OD-Messungen durchgeführt. Durch die nahezu vollständige Sättigung der umgebenden Atmosphäre konnte ein Verdunsten der Probenvolumen verhindert und eine gleich bleibende Antibiotikakonzentration gewährleistet werden. Da insbesondere bei *S. aureus* eine Agglutinerung der Zellen (Biofilmbildung) stattfindet, wurden alle Testplatten zusätzlich konstant mit 120 rpm geschüttelt, um valide Messwerte zu erhalten. Es erfolgte stets eine Dreifachbestimmung über einen Zeitraum von 16 Stunden. Die Tests wurden gemäss GLP-Vorgaben mehrfach und an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

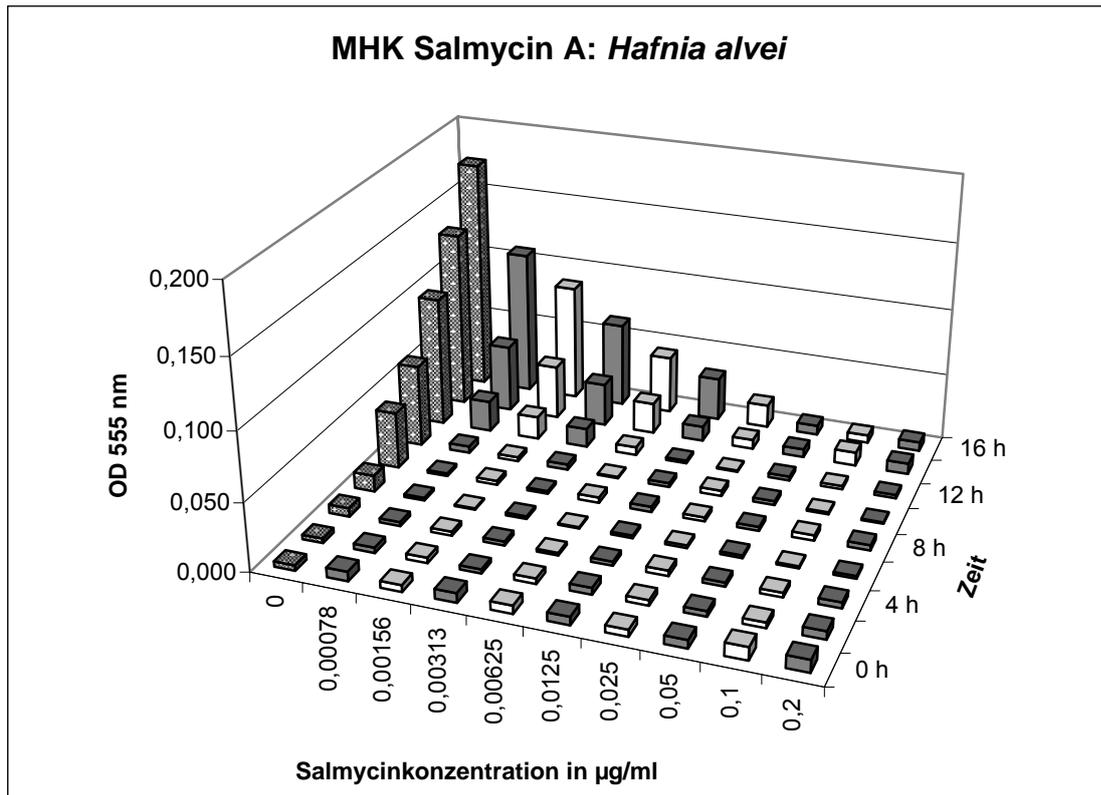
### C.3.2. Bestimmung der MHK von Salmycin A bei Gram-negativen Bakterien

Für die untersuchten Gram-negativen Bakterien wurden Salmycinkonzentrationen von von 400 µg/ml bis 0,0008 µg/ml angesetzt. Als Kontrollantibiotikum diente Gentamicin. Es konnten folgende MHK-Werte ermittelt werden:

**Tab. C-VI** : Ermittelte MHK-Werte von Salmycin A bei Gram-negativen Teststämmen; Standardfehler: ±1 Verdünnungsstufe, dreifachbestimmt.

	MHK	MHK - Gentamicin
<i>Hafnia alvei</i>	> 0,05 µg/ml	> 0,05 µg/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	0,25 – 1 µg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 0,1 µg/ml	> 0,1 µg/ml

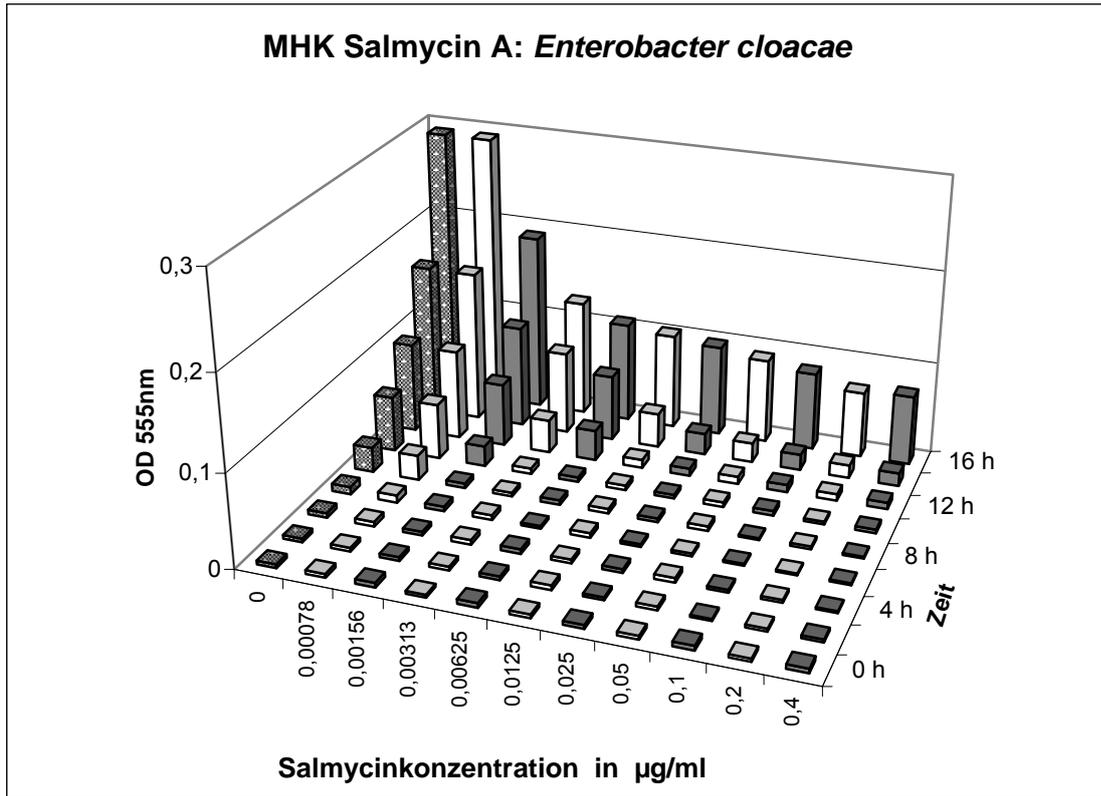
*Hafnia alvei* zeichnete sich durch ein langsames Wachstum aus und unterschied sich hierdurch deutlich von den übrigen Teststämmen. Innerhalb der Versuchsdauer von 16 h erreichte die Negativkontrolle (PBS) der angeimpften Kultur eine OD<sub>555</sub> 0,16. Eine Salmycingabe von 100 – 0,5 µg/ml unterband das Wachstum den gesamten Testzeitraum. In den Konzentrationen von 0,025 – 0,0063 µg/ml setzte nach 14 Stunden ein Wachstum ein. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,0031 – 0,0008 µg/ml) konnte bereits nach 12 Stunden bakterielles Wachstum beobachtet werden. Die MHK von Salmycin A für *Hafnia alvei* liegt somit bei > 0,05 µg/ml (s. Abb. C15).



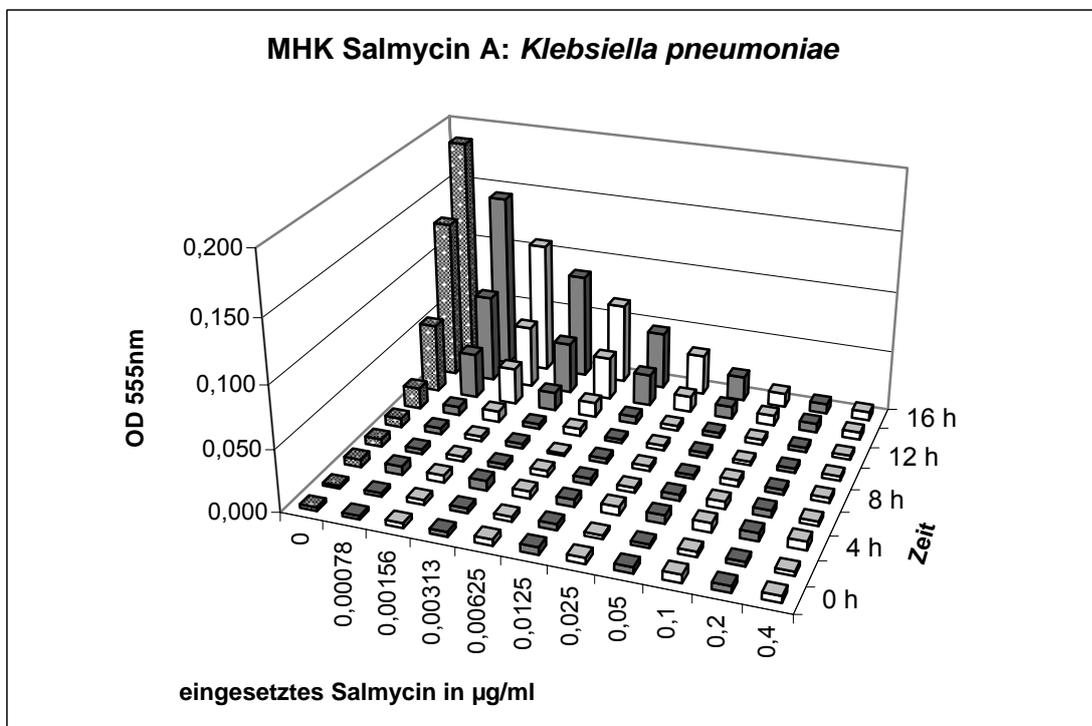
**Abb. C15 :** Diagramm der MHK-Bestimmung von Salmycin A bei *Enterobacter cloacae* (0607); 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt,  $n=3$ , Werte gemittelt.

Die Bestimmung des MHK-Wertes von *Enterobacter cloacae* gestaltete sich am schwierigsten, da es mehrfach zu einer Kontamination der Proben kam (s. Abb. C16). Um die auswertbaren Daten zu extrapolieren, musste die Reinheit der Kultur mit MacConkey-Medium permanent kontrolliert werden. In allen Ansätzen von 0,025 mg/ml bis zur verwendeten Höchstkonzentration von 0,4 mg/ml setzte nach etwa 14 Stunden Wachstum ein. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde bereits nach acht bis zwölf Stunden ein Wachstum gemessen. Die MHK von Salmycin konnte daher nicht exakt bestimmt werden.

Der ermittelte MHK-Wert für *Klebsiella pneumoniae* beträgt  $> 0,1 \mu\text{g/ml}$  und liegt damit etwa doppelt so hoch wie die MHK von *H. alvei*. Auch hier konnte stets ein langsam einsetzendes Wachstum im letzten Drittel der Inkubationszeit beobachtet werden (s. Abb. C17).



**Abb. C16 :** Diagramm der MHK-Bestimmung von Salmycin A bei *Enterobacter cloacae* (0607); 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt, n=3, Werte gemittelt.



**Abb. C17:** Diagramm der MHK-Bestimmung von Salmycin A bei *Klebsiella pneumoniae* (2164); 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt, n=3, Werte gemittelt.

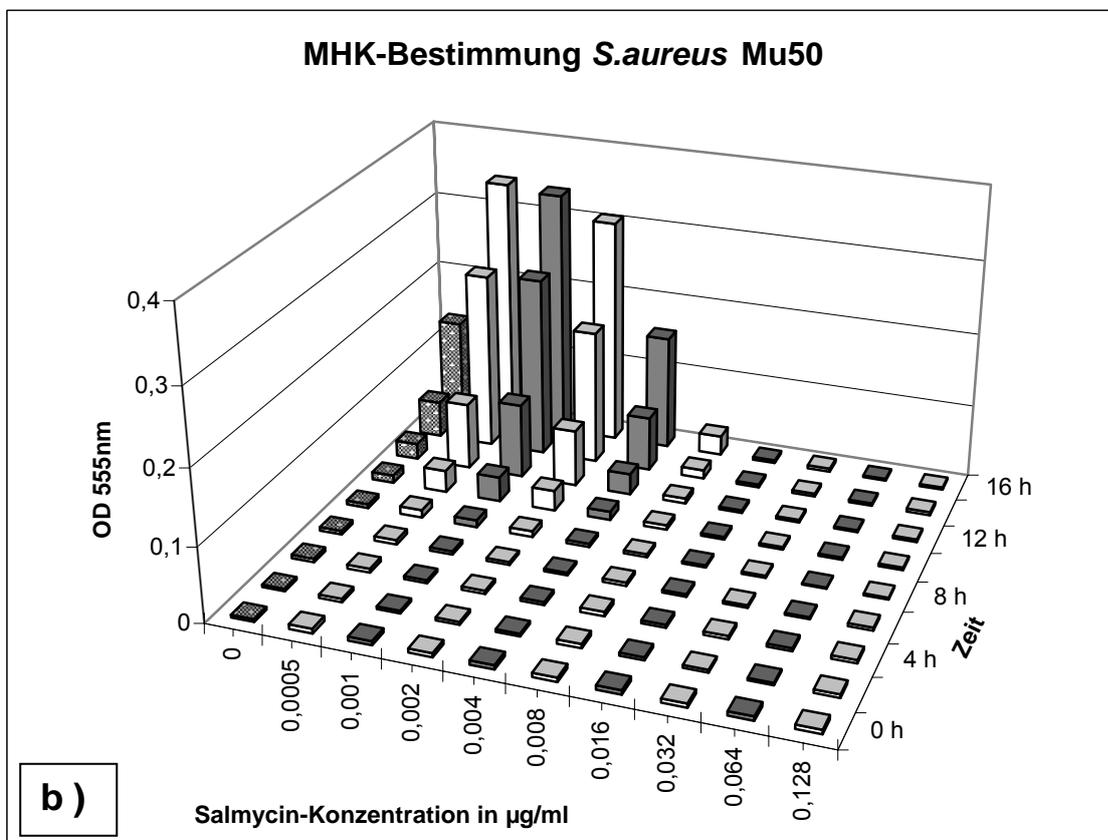
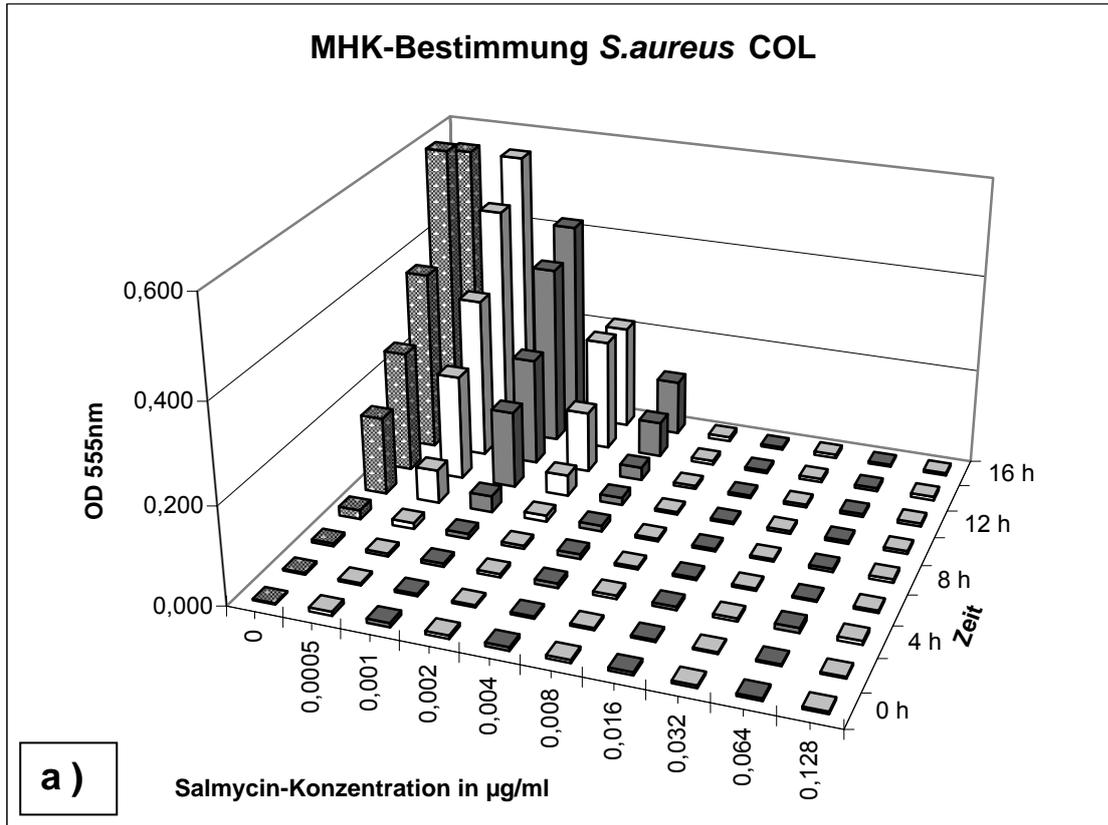
### C.3.3. Die MHK von Salmycin A bei *S. aureus*

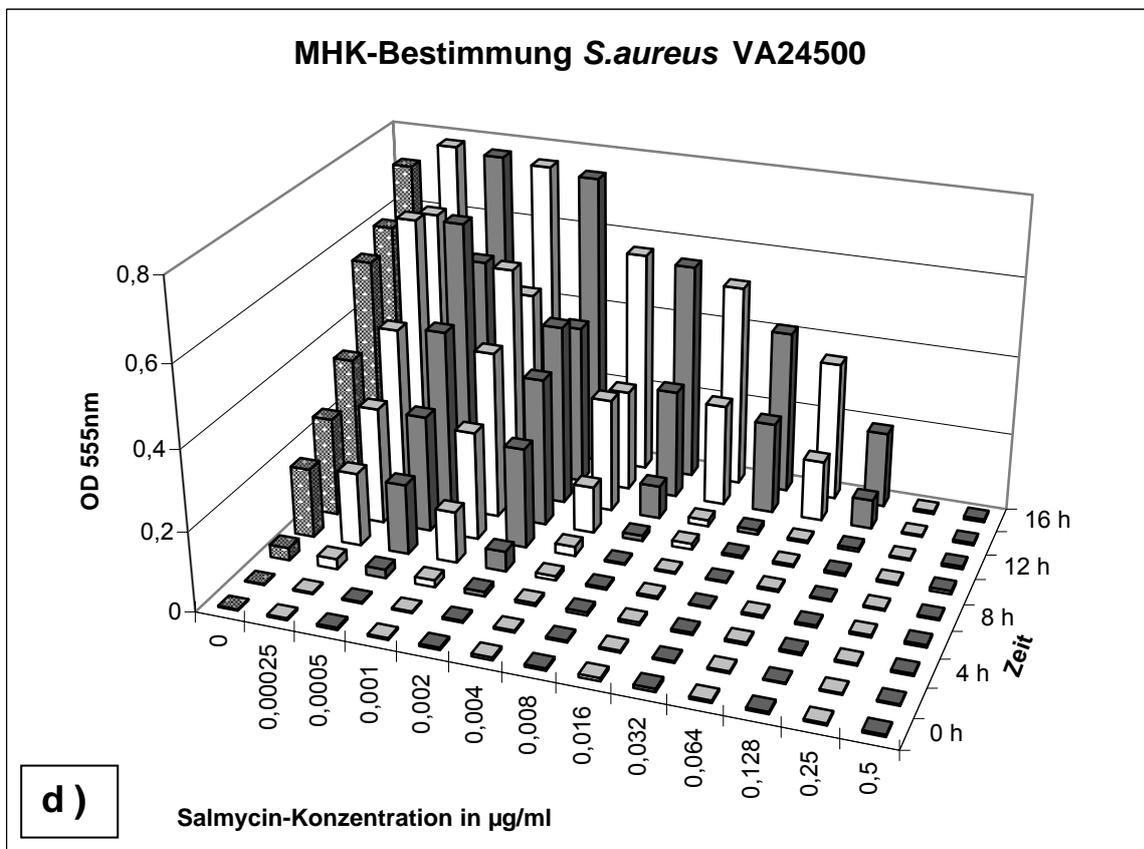
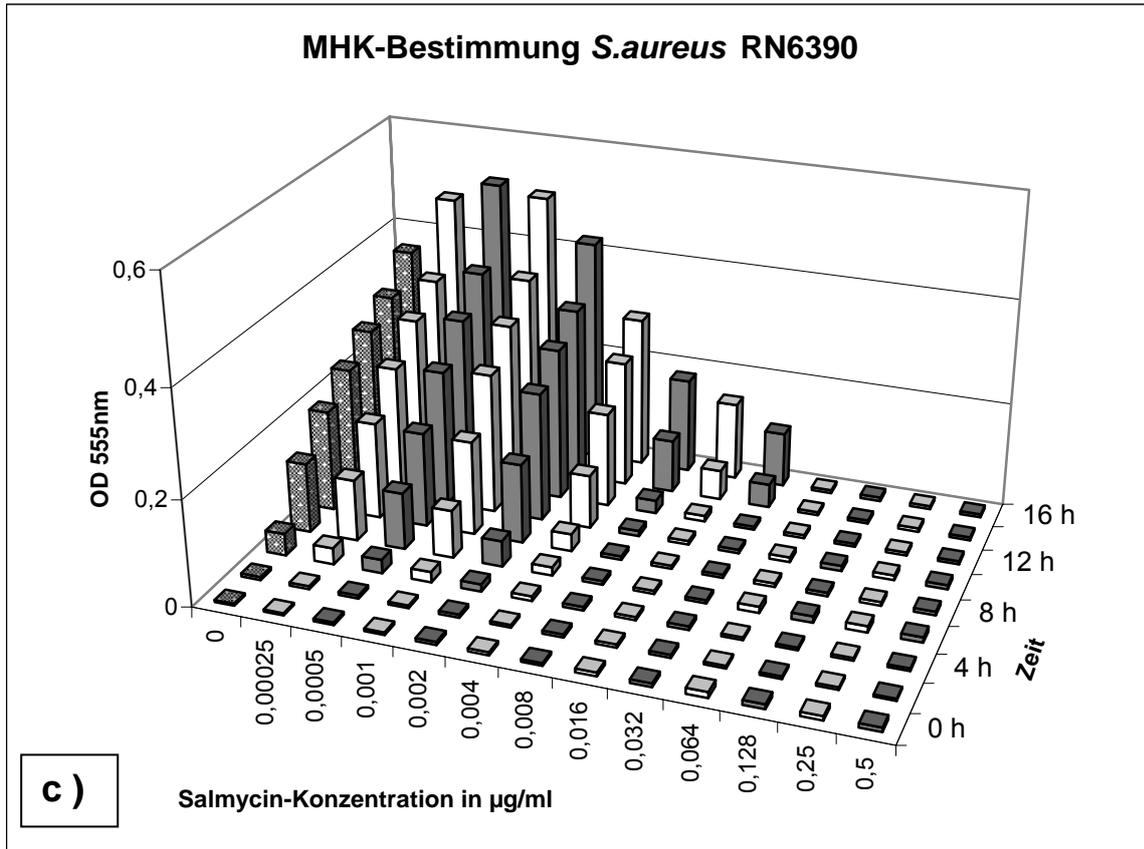
Die MHK für *S. aureus* wurde an drei definierten Laborstämmen (RN6390, COL und Mu50) und einem Patientenisolat (VA24500) bestimmt. Durch die Auswahl verschiedener Varianten sollten vergleichbare Daten zwischen dem Verhalten von Wildtypstamm und attenuierten Laborstämmen hinsichtlich Sensitivität und Resistenz gewonnen werden.

**Tab. C-VII** : Ermittelte MHK-Werte von Salmycin A bei *S. aureus*. Standardfehler:  $\pm 1$  Verdünnungsstufe, n=3 (Details siehe Abb. 18a – d)

Stamm	Beschreibung	MHK Salmycin	MHK Vancomycin
COL	MRSA	> (4) 8 ng/ml	> 3,9 $\mu$ g/ml
Mu50	VRSA	> 8 ng/ml	-
RN 6390	Laborstamm	> 31 ng/ml	> 3,9 $\mu$ g/ml
VA 24500	Patientenisolat	> 125 ng/ml	> 3,9 $\mu$ g/ml

Als Kontrollsubstanz wurde Vancomycin verwendet, welches gegen Gram-positive Bakterien hohe Aktivität zeigt und in der Klinik als Reserveantibiotikum eingesetzt wird. Bei *S. aureus* COL handelt es sich um einen MRSA-Stamm, bei *S. aureus* Mu50 um einen vancomycinresistenten Keim. Letzterer zeigt im Plattendiffusionstest eine besonders hohe Sensitivität gegen Salmycin A ( $\pm 41$  mm bei 1 mg/ml Salmycin A im Vergleich zu 28–31 mm bei anderen *S. aureus*-Stämmen). Die Stämme COL und Mu50 wiesen eine MHK von 4 – 8 ng/ml auf. Der MRSA-Stamm COL zeigte sich dabei tendenziell um etwa eine Verdünnungsstufe sensitiver als Mu50. Während der Stamm COL ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Vergleichsstämme aufwies, wuchs Mu50 stets beträchtlich langsamer. Sowohl für den Laborstamm RN6390 als auch für das Patientenisolat VA24500 konnte ein deutlich höherer MHK ermittelt werden. RN6390 wurde von einer Salmycinkonzentration von >31 ng/ml gehemmt, VA24500 von >125 ng/ml (s. Abb. C18). Die Kontrolle konnte den von Vancomycin bekannten MHK-Wert bei *S. aureus* von >4  $\mu$ g/ml im Test bei den sensitiven Stämmen verifizieren (s. Abb. C19). Somit zeigte Salmycin A in den *in-vitro*-Bestimmungen eine um 32–500fach höhere Wirksamkeit als ein vergleichbares, klinisch angewandtes Aminoglykosid-Antibiotikum.

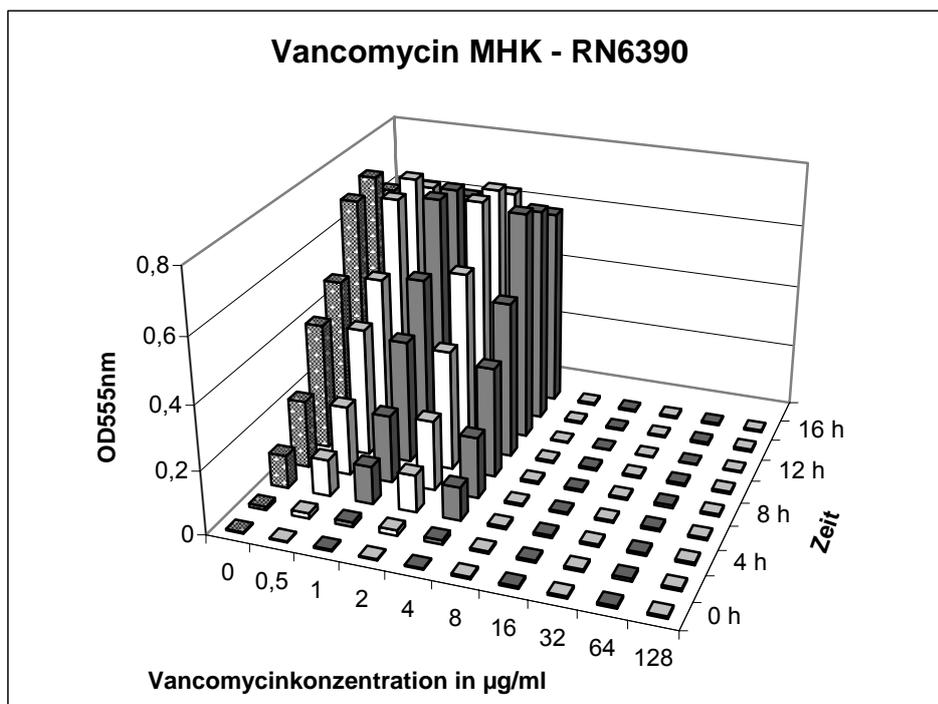




**Abb. C18a-d:** Diagramm der MHK-Bestimmung von Salmycin A bei *S. aureus* COL, Mu50, RN6390 und VA24500; 100 µl Volumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt,  $n=3$ , Werte gemittelt.

### 3.4. Vergleich der Hemmwirkungen von Salmycin A und Vancomycin

Im Vergleich der Wachstumskurven von *S. aureus* unter dem Einfluss der beiden Antibiotika fielen eindeutige Unterschiede auf. Die Hemmwirkung von Vancomycin ist durch eine scharfe Abgrenzung wachsender und gehemmter Proben gekennzeichnet. Abb. C19 zeigt deutlich, dass bei Vancomycin diese Grenze in einziger Abhängigkeit zur verwendeten Antibiotikumkonzentration steht. Die Wachstumsverläufe unter Verwendung von Salmycin zeigen dagegen stets einen kontinuierlichen Anstieg, der abhängig ist von zwei Dimensionen: verwendete Konzentration und Zeit. Dieser Verlauf konnte bei allen Testkeimen in vergleichbarer Tendenz beobachtet werden und ist daher als typisch zu bezeichnen (siehe Abb. 15 – 17, 18a - d). Als mögliche Ursache dieses Effekts ist eine kontinuierliche Konzentrationsverringerung des Antibiotikums im Medium. Dies kommt entweder durch den Verbrauch der Substanz oder deren Abbau zustande. Ein weiterer zu beobachtender Effekt ist der Einfluss von Salmycin auf das Wachstumsverhalten von *S. aureus* bei sehr geringen Konzentrationen ( $< 4$  ng/ml). In diesem Bereich zeigten alle getesteten Stämme ein stärkeres Wachstum als die Kontrolle ohne Salmycin. Der wachstumsfördernde Effekt könnte daraus resultieren, dass geringe Mengen des Antibiotikums rasch verbraucht oder abgebaut werden, und den überlebenden Keimen verwertbares Eisen zur Verfügung gestellt wird.



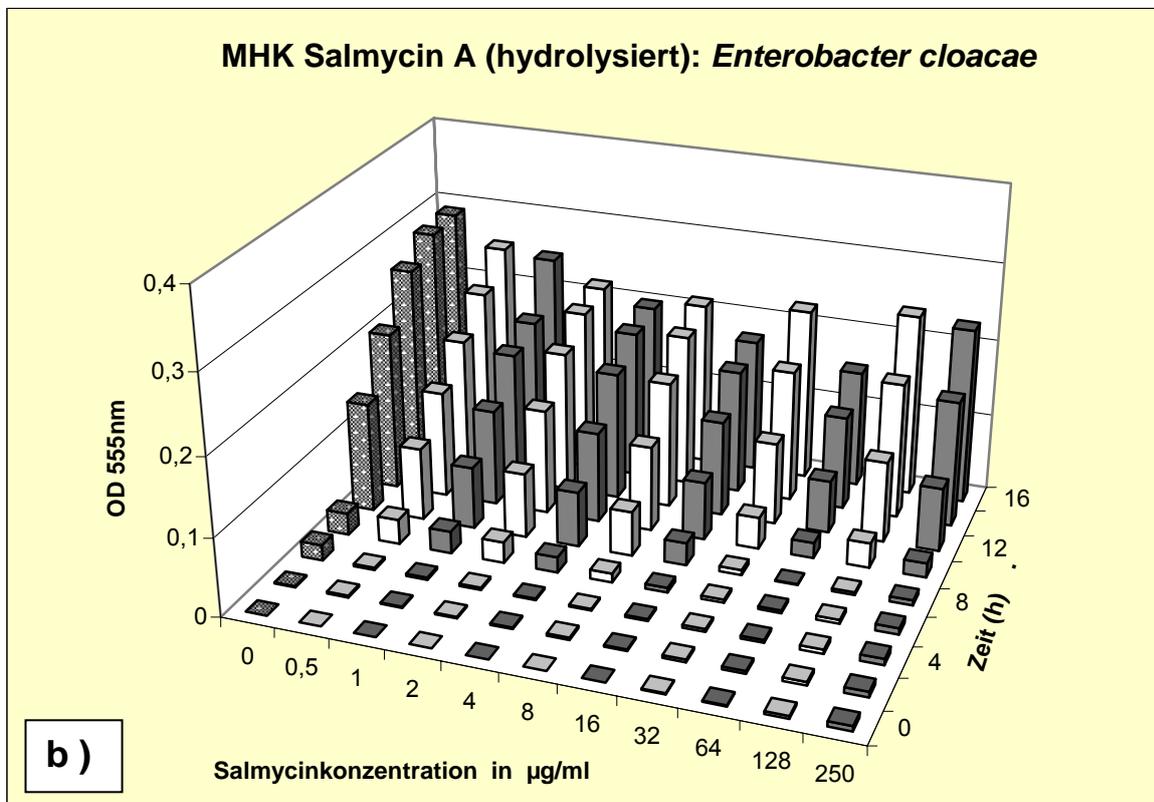
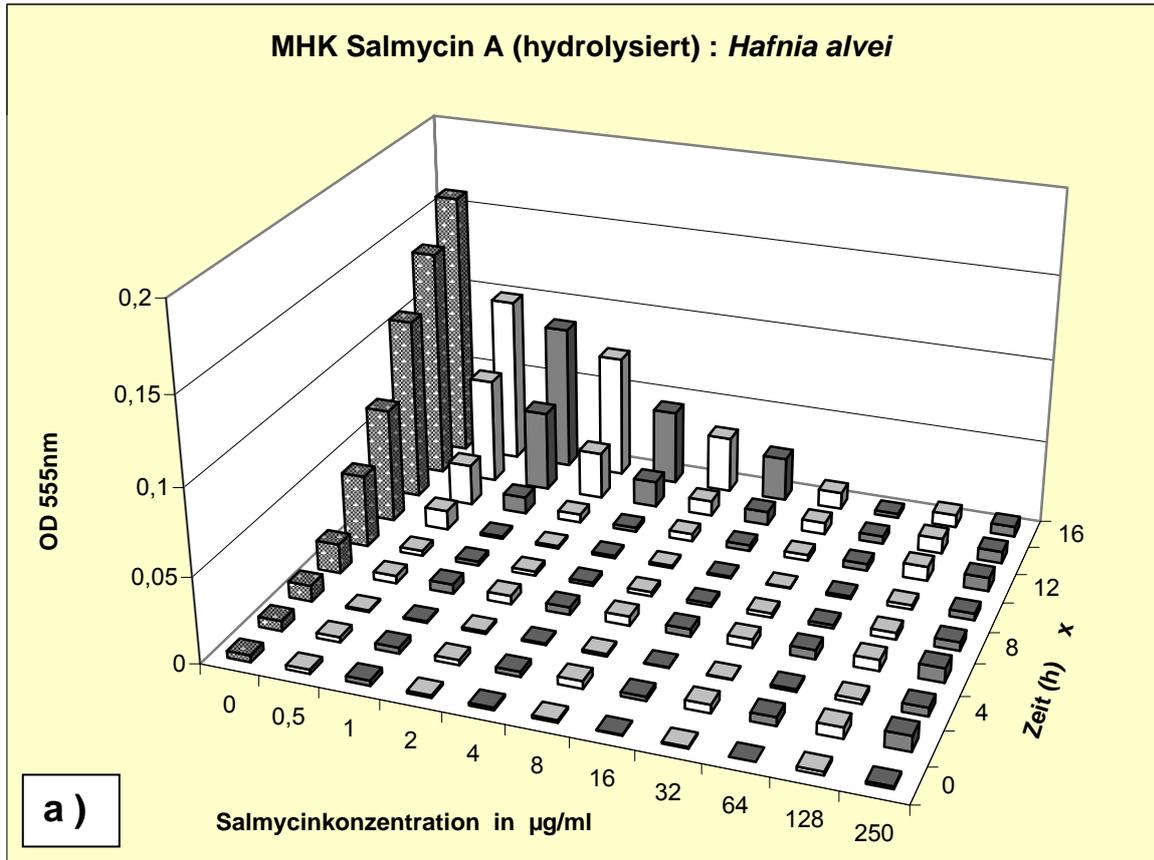
**Abb. C19** : Diagramm der Positivkontrolle (Vancomycin) bei *S. aureus* (RN 6390); 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt,  $n=3$ , Werte gemittelt.

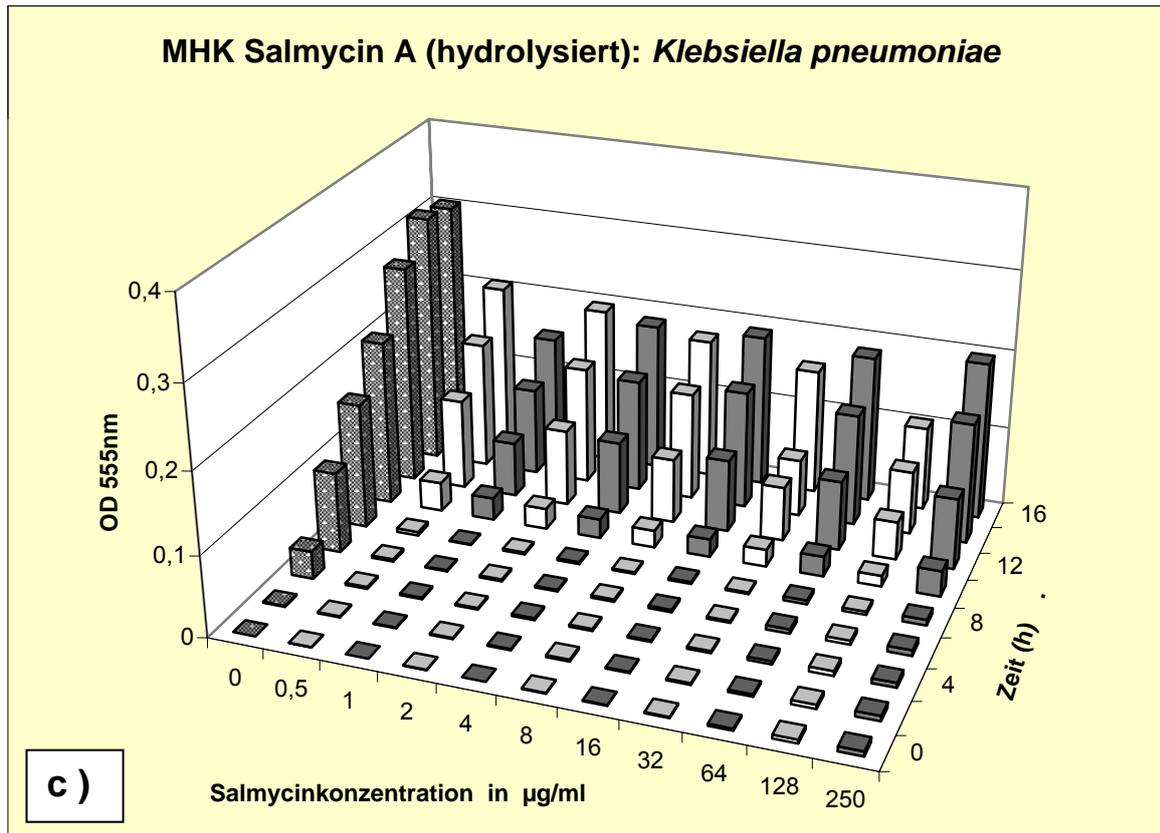
## C.4. Der antibiotische Effekt von teilhydrolysiertem Salmycin

Das beobachtete Wachstumsverhalten der Teststämme unter Salmycineinfluss (s. C.3.4.) und die während der Aufreinigung beobachtete Tendenz der Substanz zum Hydrolysieren führten zu der Fragestellung, welchen Effekt Abbauprodukte von Salmycin auf sensitive Keime haben. Dieser Aspekt war insbesondere hinsichtlich einer klinischen Anwendungsmöglichkeit von Sideromycinen und der Gefahr der Resistenzbildung von Relevanz. Es musste geprüft werden, ob die permanent in den Salmycin-Hemmhöfen auftretenden resistenten Kolonien eine Folge des Abbaus des Antibiotikums sind. Zu diesem Zweck wurde eine zweite Versuchsreihe zur MHK-Bestimmung durchgeführt. Hierzu wurde anstatt der frisch angesetzten Substanz eine Salmycin-Lösung (Stammlösung: 1 mg/ml in PBS, pH 7,2) verwendet, die bis zum Einsetzen sieben Tage im Kühlschrank gelagert wurde. Durch diesen Zeitraum wurde sichergestellt, dass ein grosser Anteil der Substanz hydrolysiert war (s. C.1.2.5.). Im Folgenden wird hierfür die Bezeichnung *teilhydrolysiertes Salmycin* gebraucht. In dieser Versuchsreihe wurden die Hemmwirkung und die Anzahl der auftretenden resistenten Keime in den unterschiedlichen Spezies erfasst.

### C.4.1. Effekt von teilhydrolysiertem Salmycin auf Gram-negative Keime

Bei *Hafnia alvei* konnte beobachtet werden, dass die minimale Hemmkonzentration um den Faktor 300 anstieg (siehe Abb. C20a; MHK > 31,3 µg/ml). Der ansteigende Verlauf bei geringer werdenden Konzentrationen blieb identisch. Bei *Enterobacter* und *Klebsiella* hatte die Gabe von teilhydrolysiertem Salmycin zur Folge, dass lediglich eine retardierende Hemmwirkung beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wurde in allen verwendeten Verdünnungsstufen beobachtet (max. Konzentration 500 µg/ml). Somit wurden die Keime über einen Zeitraum von sechs bis acht Stunden (*Enterobacter*, siehe Abb. C20b) bzw. zehn Stunden (*Klebsiella*; siehe Abb. C20c) im Wachstum gehemmt. Das anschliessend einsetzende Wachstum entspricht dem exponentiellen Verlauf einer regulären Wachstumskurve in Flüssigmedium. Die Unterschiede in den ermittelten Werten innerhalb der überprüften Gram-negativen Keime können sich auf die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Spezies zurückführen lassen.





**Abb. C20a-c** : Diagramme der Wachstumsverläufe von (a) *Hafnia alvei* (5046), (b) *Enterobacter cloacae* (0607) und (c) *Klebsiella pneumoniae* (2164) bei Gabe von hydrolysiertem Salmycin A; 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt,  $n=3$ , Werte gemittelt.

Es ist denkbar, dass *Hafnia alvei* eine so geringe Teilungsrate aufweist, dass einerseits rasch viele Zellen getötet werden und andererseits nur wenig Salmycin aufgenommen wird, so dass die im Medium verbleibende Konzentration zur kompletten Tilgung der Population genügt. *Enterobacter* und *Klebsiella* weisen eine höhere Aufnahmerate und raschere Teilung auf, so dass die ins Medium eingebrachte Antibiotikummenge rasch verbraucht wird. Die zusätzlich vorhandenen Abbauprodukte von Salmycin führen im weiteren Verlauf zu einer Förderung des Wachstums.

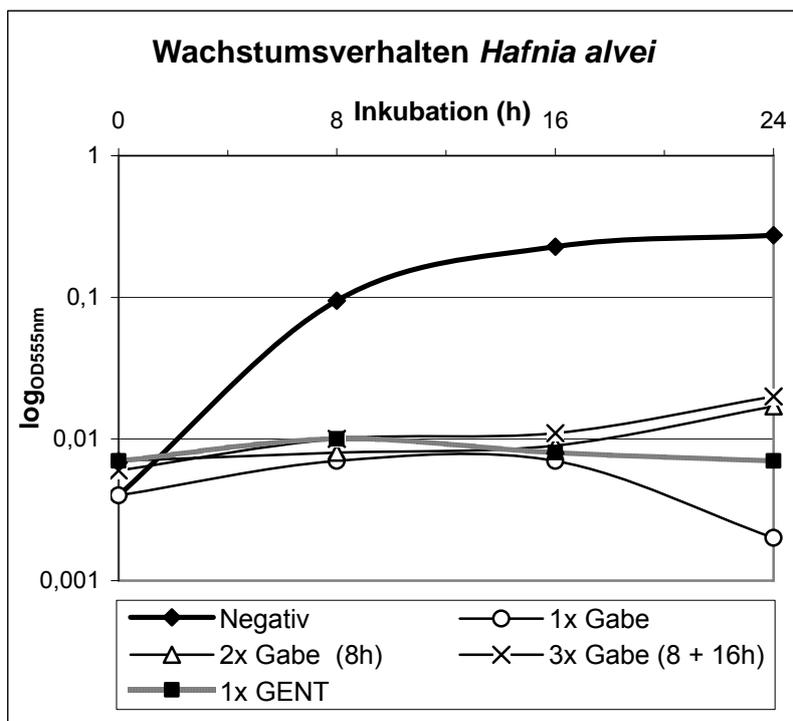
#### **C.4.2. Effekte von Mehrfachgaben von teilhydrolysiertem Salmycin auf Enterobakterien**

Die Beobachtung der abgeschwächten Hemmwirkung der teilhydrolysierten Substanz, und die daraus resultierende Erhöhung der MHK führte zu der Fragestellung, zu welchen weiteren Effekte dies hinsichtlich einer Resistenzbildung innerhalb einer Bakterienpopulation führt. Sollte tatsächlich eine rasche Degradierung des Moleküls stattfinden, die durch bakterielle Enzyme beschleunigt wird, könnte die Freisetzung von Abbauprodukten die Hemmwirkung nicht nur verkürzen oder schwächen, sondern

auch gegenteilige Effekte besitzen. Zusätzlich zur einfachen Gabe wurde untersucht, ob eine bzw. zwei weitere Gaben von Salmycin (identische Dosis) nach acht bzw. acht und 16 Stunden weiterhin hemmende Wirkung besitzen.

Tatsächlich führten alle Tests mit der teilhydrolysierten Substanz zu deutlichen Veränderungen im Wachstumsverhalten der Keime. In allen Versuchsansätzen wurde das Wachstum innerhalb der ersten acht Stunden unterdrückt. Hier decken sich die Daten mit jenen der MHK-Bestimmung. Im weiteren Verlauf zeigten alle Ansätze mit teilhydrolysiertem Salmycin einsetzendes Wachstum, das sich bei *Ent. cloacae* und *K. pneumoniae* rasch dem Wert der Negativkontrolle annäherte. Weitere Gaben zeigten keinerlei hemmenden Effekt. Tendenziell führte eine einfache Salmycingabe zur stärksten Hemmwirkung.

Bei der am höchsten sensitiven Spezies *Hafnia alvei* war die Differenz zwischen Einfach- und Mehrfachgabe gering und lediglich als Trend erkennbar (s. Abb. C21). Die verwendete Konzentration unterdrückte das Wachstum nahezu vollständig. Bei doppelter Gabe war die OD<sub>555</sub> leicht erhöht, was eventuell durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums durch das zusätzliche Salmycin zu erklären ist.

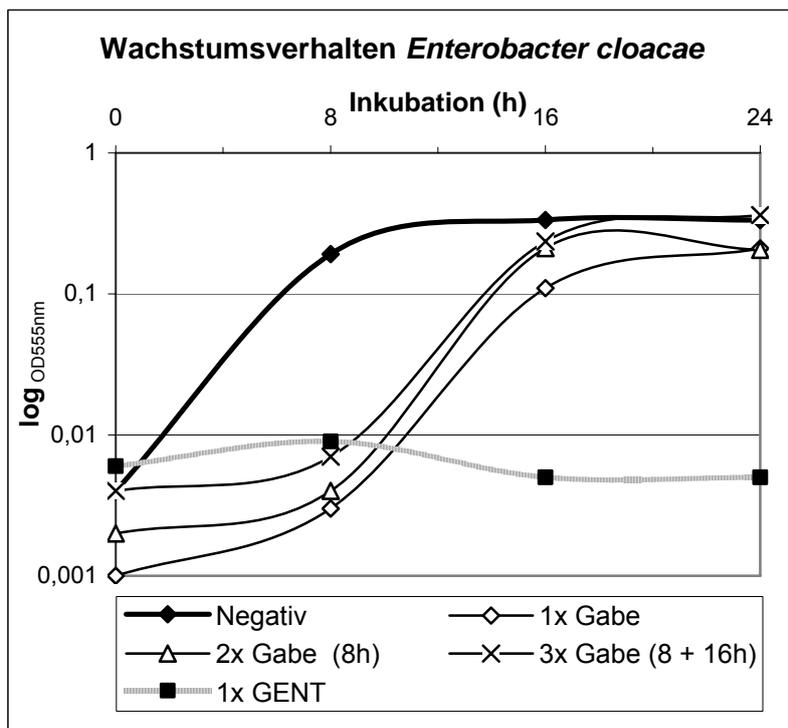


Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,007
Negativ	0,275
1x Gabe	0,002
2x Gabe	0,017
3 x Gabe	0,020

**Abb. C21 :** Logarithmische Wachstumskurve von *H. alvei* unter Zugabe von Salmycin (100 µg/ml pro Gabe). 1x = einfache Gabe bei t=0 2x = zweite Gabe nach 8 h 3x = zusätzliche Gaben nach 8h und 16 h; Positiv = Gentamicin (1 mg/ml), negativ = PBS (o. SAL), n=3, gemittelt

Nach 24 Stunden Inkubation konnten die beobachtete Tendenz bestätigt werden. Die einfache Salmycingabe bei *Hafnia alvei* zeigte weiterhin ein unterdrücktes Wachstum, die zwei- und dreimalige Gabe eine leicht erhöhte OD<sub>555</sub> (0,017 und 0,02). Insgesamt betrachtet, zeigte das teilhydrolysierte Salmycin noch immer einen ausreichenden Hemmeffekt.

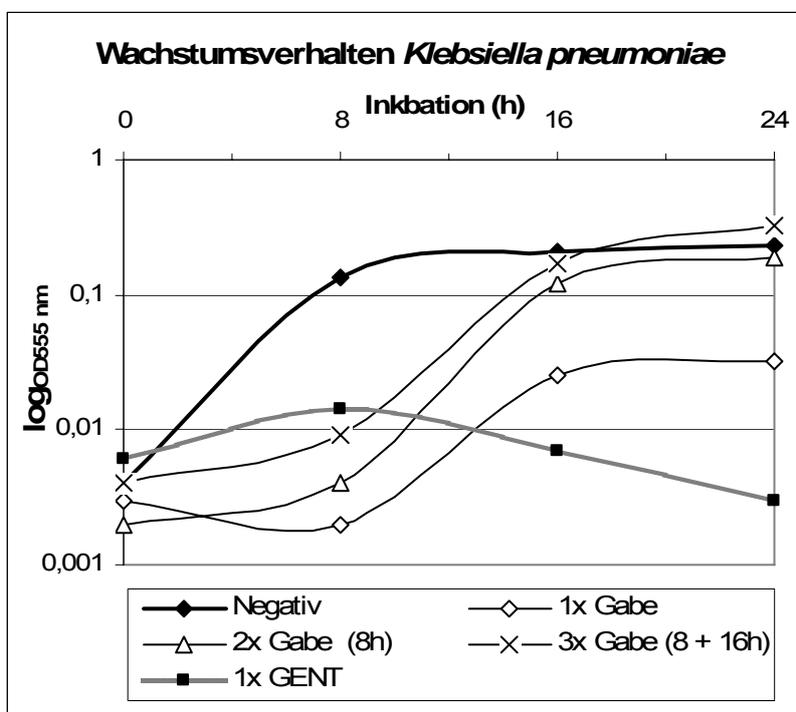
Sämtliche Ansätze von *Enterobacter cloacae* hatten nach 16 Stunden bereits eine OD<sub>555</sub> von 0,1 überschritten (vgl. Abb. C.22). Die Ansätze mit doppelter Gabe Salmycin wiesen mit einer OD<sub>555</sub> 0,212 bzw. 0,236 höhere Werte auf als die einfache Gabe (OD<sub>555</sub> 0,11), was auf einen wachstumsfördernden Effekt deutet. Sie erreichten nicht den deutlich grösseren Wert der Negativkontrolle (OD<sub>555</sub> 0,334). *Enterobacter cloacae* zeigte nach 24 Stunden Inkubation mit Salmycin die deutlichsten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Während sich die Gruppe mit dreimaliger Salmycingabe (OD<sub>555</sub> 0,363) dem Wert der Negativkontrolle (OD<sub>555</sub> 0,334) angenähert hat, liegen die Werte der einmaligen (OD<sub>555</sub> 0,21) und zweimaligen Salmycingabe (OD<sub>555</sub> 0,206) signifikant niedriger. Eine hemmende Wirkung von teilhydrolysiertem Salmycin ist bei *Ent. cloacae* nicht erkennbar und ein additiver Effekt zusätzlicher Substanzgaben somit nicht vorhanden.



Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,005
Negativ	0,334
1x Gabe	0,210
2x Gabe	0,206
3x Gabe	0,363

**Abb. C22 :** Logarithmische Wachstumskurve von *E. cloacae* unter Zugabe von Salmycin (100 µg/ml pro Gabe).  
 1x = einfache Gabe bei t=0  
 2x = zweite Gabe nach 8 h  
 3x = zusätzliche Gaben nach 8h und 16 h  
 Positiv = Gentamicin (1 mg/ml), negativ = PBS (o. SAL), n=3, gemittelt

*Klebsiella pneumoniae* wies nach 16 Stunden die deutlichste Differenz zwischen einmaliger Gabe ( $OD_{555}$  0,025) und doppelter Gabe ( $OD_{555}$  0,12 bzw. 0,169) auf (siehe Abb. C23). Nach 24 Stunden wuchsen Ansätze mit dreimaliger Salmycin-Gabe weitaus besser als die Negativkontrolle ( $OD_{555}$  0,320 zu 0,234), während Ansätze mit zweimaliger Gabe ( $OD_{555}$  0,187) sich letzterer annäherten und somit eindeutig das Wachstum förderten. Lediglich die Proben mit einfacher Substanzgabe blieben im Wachstum stark zurück ( $OD_{555}$  0,025). Bei *K. pneumoniae* konnte somit eine abgeschwächte Hemmwirkung von Salmycin beobachtet werden. Eine weitere Zufuhr der teilhydrolysierten Substanz führte jedoch zu einem besseren Wachstum.



Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,003
Negativ	0,234
1x Gabe	0,032
2x Gabe	0,187
3x Gabe	0,320

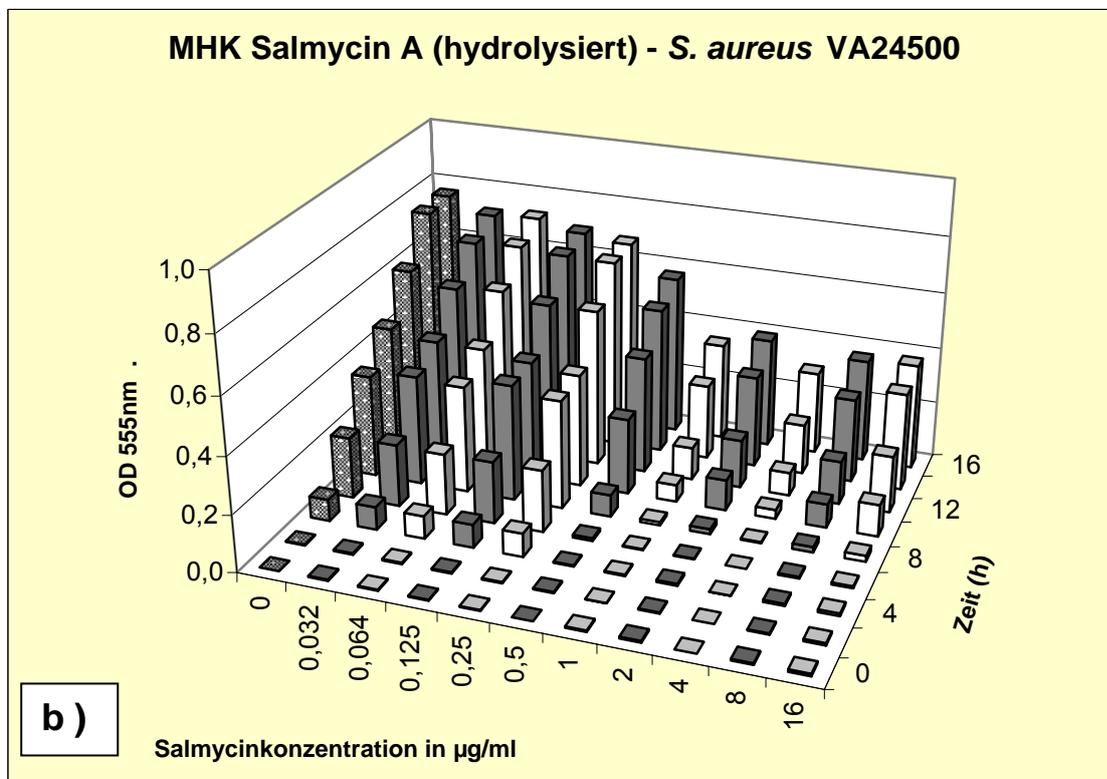
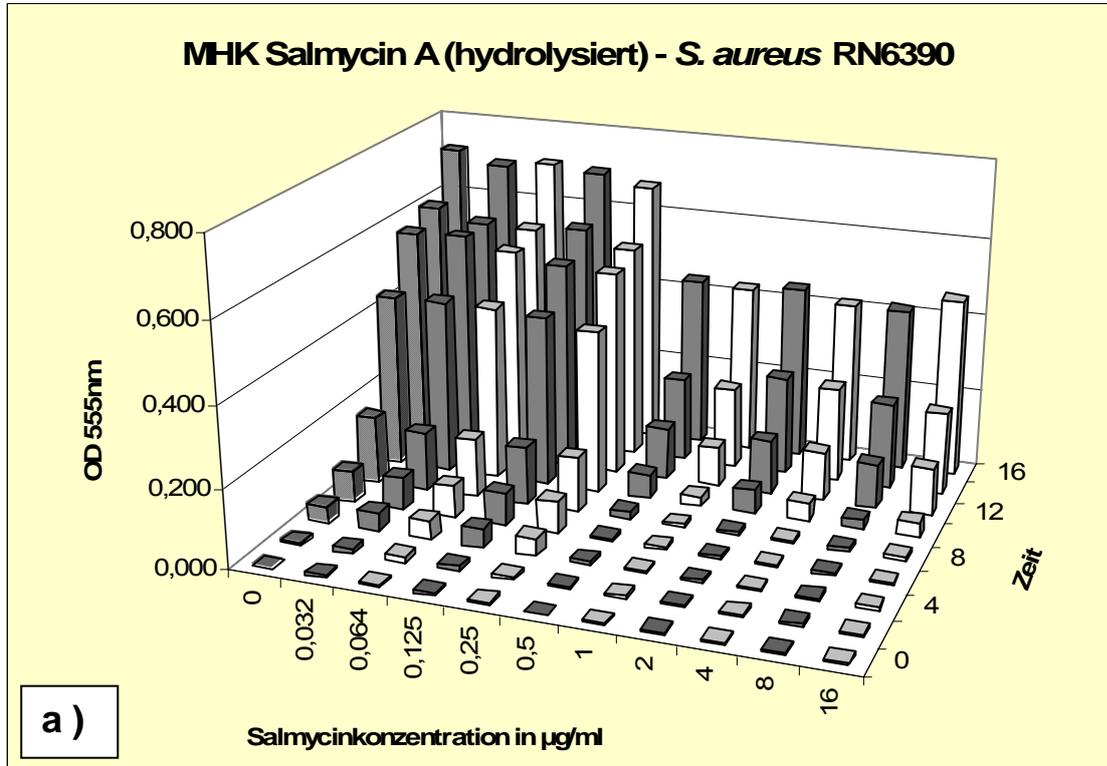
**Abb. C23 :** Logarithmische Wachstumskurve von *K. pneumoniae* unter Zugabe von Salmycin (100 µg/ml pro Gabe). 1x = einfache Gabe bei t=0, 2x = zweite Gabe nach 8 h, 3x = zusätzliche Gaben nach 8 h und 16 h. Positiv = Gentamicin (1 mg/ml), negativ = PBS (o. SAL), n=3, gemittelt

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe geben einen wichtigen Hinweis darauf, dass eine Mehrfachgabe von Salmycin keinen zusätzlich hemmenden Effekt auf Keime hat. Die Daten weisen darauf hin, dass das durch die Hydrolyse des Salmycins zugängliche Eisen den Hemmeffekt des Antibiotikums einschränkt und bei Spezies mit spezifischen Aufnahmesystemen tendenziell sogar wachstumsfördernde Wirkung besitzt.

#### C.4.3. Effekt von hydrolysiertem Salmycin auf *S. aureus*

Wie bei den Gram-negativen Testkeimen liess sich durch vergleichende Mikrodilutionsansätze auch bei *S. aureus* beobachten, dass teilhydrolysierte Salmycin-Lösungen keinen hemmenden Effekt mehr besitzen und einsetzendes Wachstum

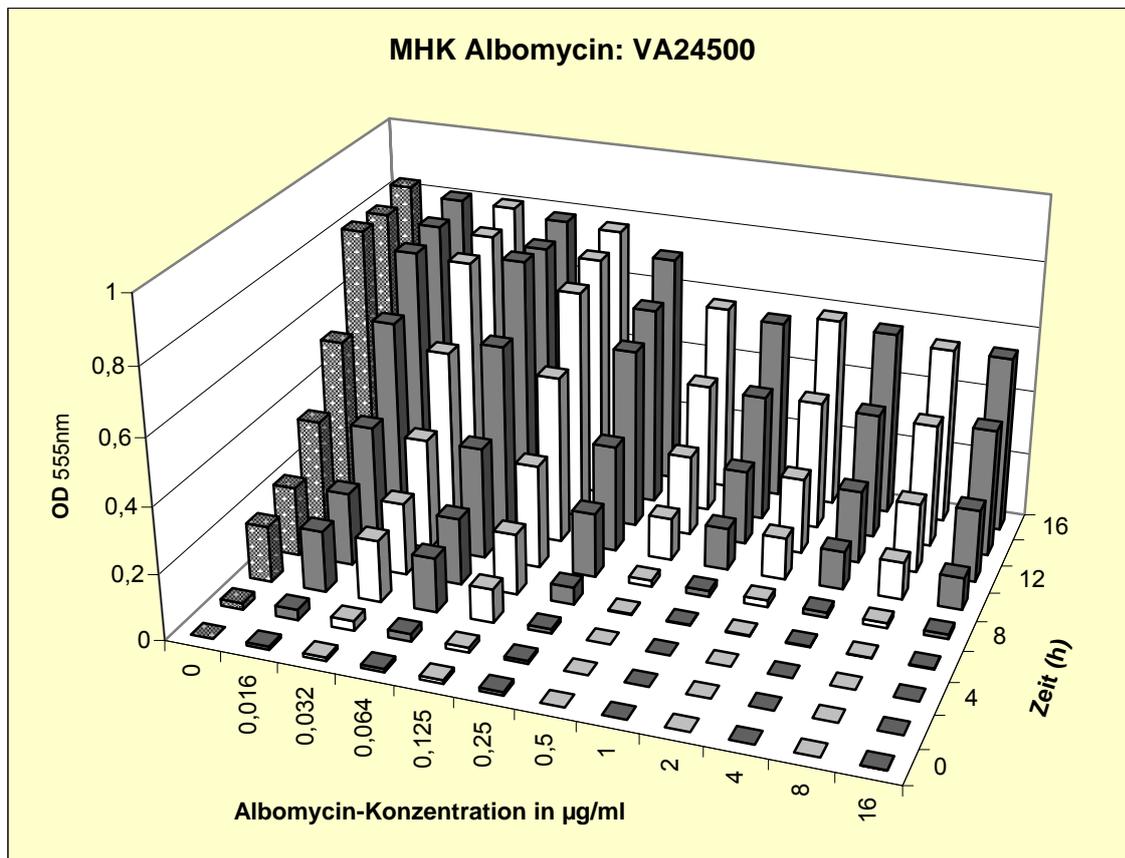
lediglich um etwa 10 Stunden hinausgezögert wird (s. Abb.24a + b). Daher ist auch bei *S. aureus* eine Wachstumsförderung durch die entstandenen Abbauprodukte denkbar.



**Abb. C24 a+b :** Diagramm der Wachstumsverläufe von *S. aureus* RN 6390 und VA24500 bei Gabe von teilhydrolysiertem Salmycin A; 100 µl Volumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt, n=3, Werte gemittelt.

#### C.4.4. Effekt von teilhydrolysiertem Albomycin auf *S. aureus*

Um festzustellen, ob der Sideromycinabbau im Medium und der daraus resultierende Verlust der Hemmwirkung ein Salmycin-spezifischer Effekt ist, wurde in identischer Weise die MHK einer Albomycin-Lösung (1 mg/ml in PBS, 30 Tage bei 4°C gelagert) bestimmt. Die Wachstumsverläufe unter Albomycin glichen denen der Salmycin-Testreihe (siehe Abb. C25). Das Albomycin hatte ebenfalls lediglich einen retardierenden Effekt auf das Wachstum von *S. aureus* von 10 bis 12 Stunden. Aus den Vergleichswerten kann man schliessen, dass auch andere Sideromycine in Lösung einem Zerfallsprozess unterliegen, der unerwünschte Nebeneffekte auf die Bakterienpopulation haben kann.



**Abb. C25** : Diagramm der MHK-Bestimmung von Salmycin A von teilhydrolysiertem Albomycin bei *S. aureus* (RN6390 und VA24500); 100 µl Gesamtvolumen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt,  $n=3$ , Werte gemittelt.

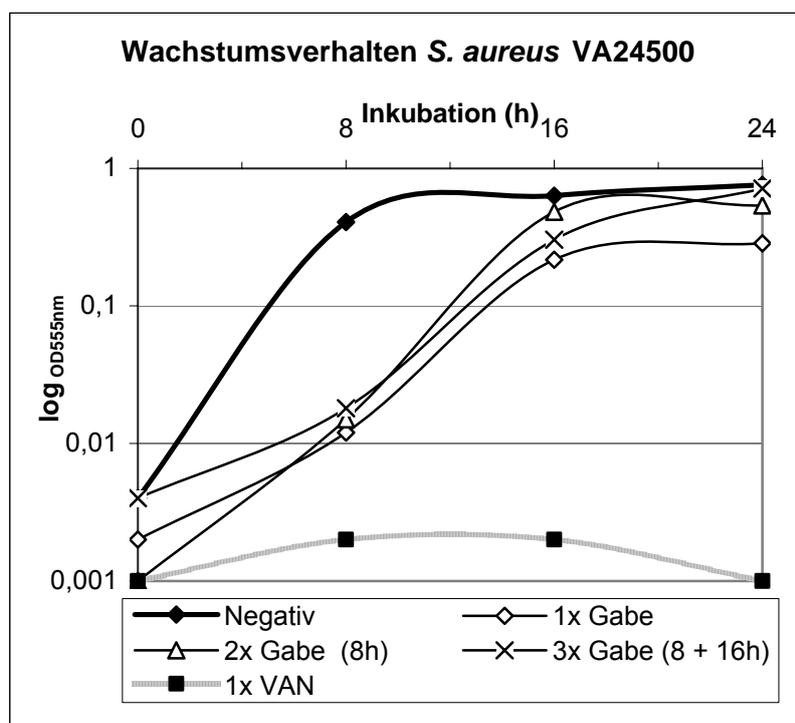
### C.4.5. Effekte von Mehrfachgaben von teilhydrolysiertem Salmycin auf *S. aureus*

Der bei den Gram-negativen Stämmen beobachtete Trend der Wachstumsförderung durch teilhydrolysiertes Salmycin setzte sich bei *S. aureus* fort. Zum Vergleich wurde hier zusätzlich das Wachstumsverhalten bei Albomycingabe untersucht.

Nach achtstündiger Inkubation hatte die Wachstumsphase bereits eingesetzt. Das Patientenisolat VA24500 (vgl. Abb. C26) zeigte bereits eine signifikante Zunahme der OD<sub>555</sub>, ebenso RN6390 mit zugesetztem Albomycin (siehe Abb. C28) und – etwas geringer ausfallend – mit Salmycin (s. Abb. C27).

Nach 16 Stunden wiesen alle Proben relativ dicht beieinander liegende Werte oberhalb einer OD<sub>555</sub> 0,1, jedoch unter dem der Negativkontrolle auf. Am prominentesten war der Unterschied beim Wildtypstamm VA24500, der gleichzeitig das rascheste Wachstum aufwies. Die Ansätze der Negativkontrollen befanden sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der lag-Phase.

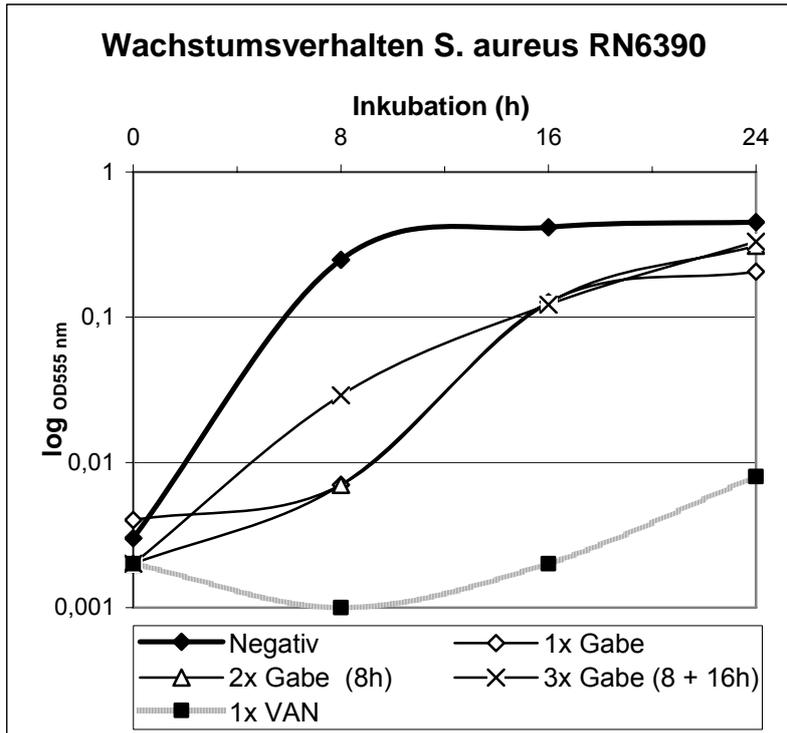
Nach 24 Stunden zeigte sich wiederum ein klarer Trend: Der einmalige Zusatz von Salmycin wies stets das niedrigste Zellwachstum aus, die dreifache Substanzgabe dagegen das höchste.



Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,001
Negativ	0,759
1x Gabe	0,285
2x Gabe	0,537
3x Gabe	0,714

**Abb. C26 :**

Logarithmische Wachstumskurve von *S. aureus* VA24500 unter Zugabe von Salmycin (100 µg/ml pro Gabe).  
1x = einfache Gabe,  
2x = zweite Gabe nach 8 h  
3x = zusätzliche Gaben nach 8h und 16 h;  
Positiv = Vancomycin (1 mg/ml), negativ = PBS ohne Salmycin, n=3, gemittelt



Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,008
Negativ	0,452
1x Gabe	0,206
2x Gabe	0,310
3x Gabe	0,332

**Abb. C27 :**

Logarithmische Wachstums-kurve von *S. aureus* RN6390 mit Salmycin (100 µg/ml pro Gabe).

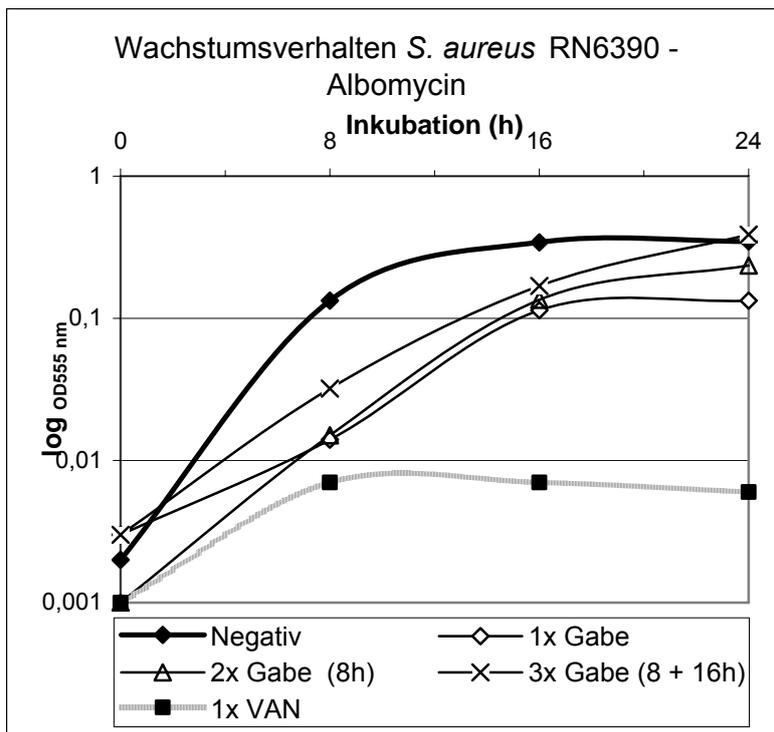
1x = einfache Gabe bei t=0

2x = zweite Gabe nach 8 h

3x = zusätzliche Gaben nach 8 h und 16 h

Positiv = Vancomycin

(1 mg/ml), negativ = PBS ohne Salmycin, n=3, gemittelt



Wert	Endpunkt 24 h
Positiv	0,006
Negativ	0,347
1x Gabe	0,133
2x Gabe	0,235
3x Gabe	0,388

**Abb. C28 :**

Logarithmische Wachstums-kurve von *S. aureus* RN6390 mit Albomycin (100 µg/ml pro Gabe).

1x = einfache Gabe

2x = zweite Gabe nach 8 h

3x = zusätzliche Gaben nach 8 h und 16 h

Positiv = Vancomycin

(1 mg/ml), negativ = PBS ohne Salmycin, n=3, gemittelt

## C.5. Resistenzbildung

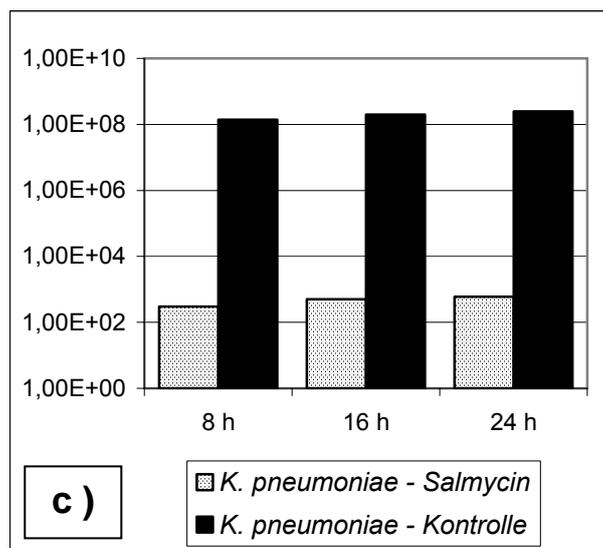
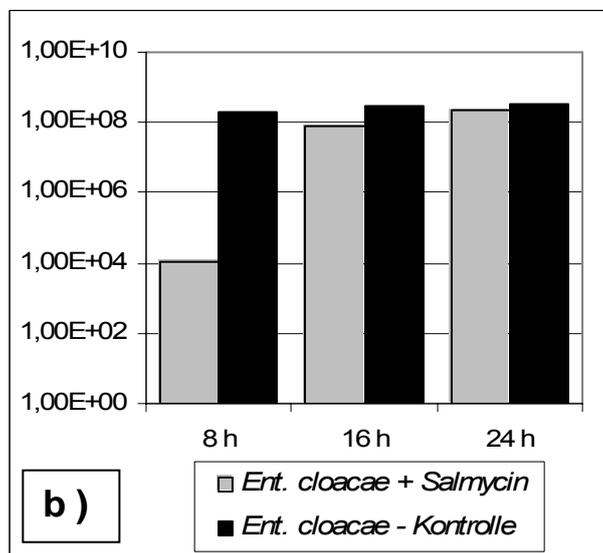
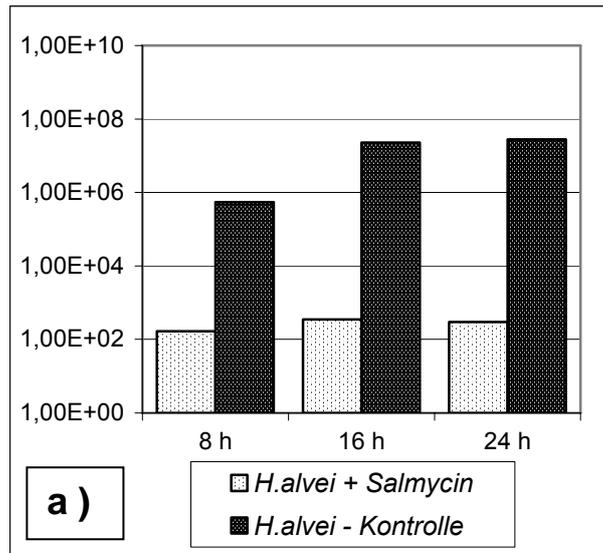
Die Testreihen zur Untersuchung der MHK von Salmycin A lieferten Indizien dafür, dass die Tauglichkeit der Substanz für eine klinische Anwendung aufgrund ihrer kurzen *in-vitro*-Halbwertszeit weiteren Prüfungen unterzogen werden sollte. Es wurde untersucht, ob die entstehenden Abbauprodukte *in-vitro* zu einer erhöhten Raten von Resistenzbildung führen. Wie in den vorherigen Tests wurde zunächst der Effekt von frischen Salmycinlösungen, dann von der teilhydrolysierten Substanz ermittelt.

### C.5.1. Resistenzentwicklung bei *Hafnia*, *Enterobacter* und *Klebsiella*

#### C.5.1.1. Überlebensrate unter Salmycineinfluss

Die Ergebnisse der Testreihe mit frisch angesetztem Salmycin spiegelten die aus der MHK-Bestimmung erhaltenen Daten wieder. Die Auszählung der Überlebensrate ergab wichtige zusätzliche Informationen. So zeigte *K. pneumoniae* die geringste Überlebensrate bei Zusatz von Salmycin A auf (0,00021 – 0,00025 %). Die Überlebensrate von *H. alvei* wurde mit 0,1 – 0,3 % errechnet. Damit erweist sich *K. pneumoniae* trotz eines höheren MHK-Wertes sensitiver gegenüber Salmycin als *H. alvei*. Wie erwartet zeigte *Ent. cloacae* mit einer Überlebensrate von 0,06 – 64,71 % die geringste Sensitivität.

Anhand der gewonnenen Daten zur Überlebensrate lassen sich bereits verschiedene Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Salmycin A ziehen. Da eine Salmycin-konzentration verwendet wurde, die weit über der für die Stämme ermittelten MHK liegt, sollte stets eine ausreichende Hemmwirkung gegeben gewesen sein. Allerdings weisen die Teststämme trotz Salmycingabe eine kontinuierliche Zunahme der Keimzahl innerhalb der gemessenen Zeitspanne auf (vgl. Tab. C-VIII). Mehrere Faktoren können hierfür eine Rolle spielen. *H. alvei* und *K. pneumoniae* werden von Salmycin stark gehemmt und die Keimzahlen verdoppeln sich lediglich im Bereich weniger Hundert cfu. Dabei mag bei *H. alvei* die geringere Wachstumsrate und dem damit verbundenen Eisenstoffwechsel eine Rolle spielen. *K. pneumoniae* weist dagegen ein ähnlich rasches Wachstum wie *Ent. cloacae* auf, wohingegen sich die Zahlen überlebender Keime jedoch beträchtlich unterscheiden (vgl. 29 b + c).



**Abb. C29a-c** : Grafische Darstellung der Zellzahlen von *H. alvei* (a), *Ent. cloacae* (b) und *K. pneumoniae* (c) in 100 µl-Ansätzen mit 50 µg/ml Salmycin A verglichen mit Kontrollansatz (PBS) n=3 , gemittelt; Zellzahlen in der y-Achse: 1,00E+10 entsprechen 1x10<sup>10</sup> Zellen usw.

**Tab. C-VIII :** Überlebensrate der untersuchten Gram-negativen Pathogene (100 µl Volumen NB+D-Medium,  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt; Salmycin-Konzentration 50 µg/ml, Kontrolle: PBS).

	<b>cfu/ml nach 8 h Salmycin / Kontrolle</b>	<b>cfu/ml nach 16 h Salmycin / Kontrolle</b>	<b>cfu/ml nach 24 h Salmycin / Kontrolle</b>
<i>Hafnia alvei</i> (5064)	$1,65 \times 10^3 / 5,5 \times 10^5$ <b>Anteil: 0,3 %</b>	$3,5 \times 10^3 / 2,3 \times 10^7$ <b>Anteil: 0,02 %</b>	$3 \times 10^3 / 2,8 \times 10^7$ <b>Anteil: 0,01%</b>
<i>Enterobacter cloacae</i> (0607)	$1,1 \times 10^5 / 1,9 \times 10^8$ <b>Anteil: 0,06%</b>	$7,5 \times 10^7 / 3,1 \times 10^8$ <b>Anteil: 24,19 %</b>	$2,2 \times 10^8 / 3,4 \times 10^8$ <b>Anteil: 64, 71 %</b>
<i>K. pneumoniae</i> (2164)	$3 \times 10^2 / 1,4 \times 10^8$ <b>Anteil: 0,00021 %</b>	$5 \times 10^2 / 2 \times 10^8$ <b>Anteil: 0,00025</b>	$6 \times 10^2 / 2,5 \times 10^8$ <b>Anteil: 0,00024 %</b>

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse muss auf weitere Faktoren geschlossen werden, die die Resistenz von *Ent. cloacae* gegenüber Salmycin A erklären. Denkbar ist eine Inaktivierung des Antibiotikums durch Sekretion von Hydrolasen oder anderer spaltender Enzyme ins Medium. Möglich ist auch, dass Salmycin erst im Periplasma Gram-negativer Bakterien inaktiviert wird.

### **C.5.1.2. Resistenzraten bei *Hafnia*, *Enterobacter* und *Klebsiella***

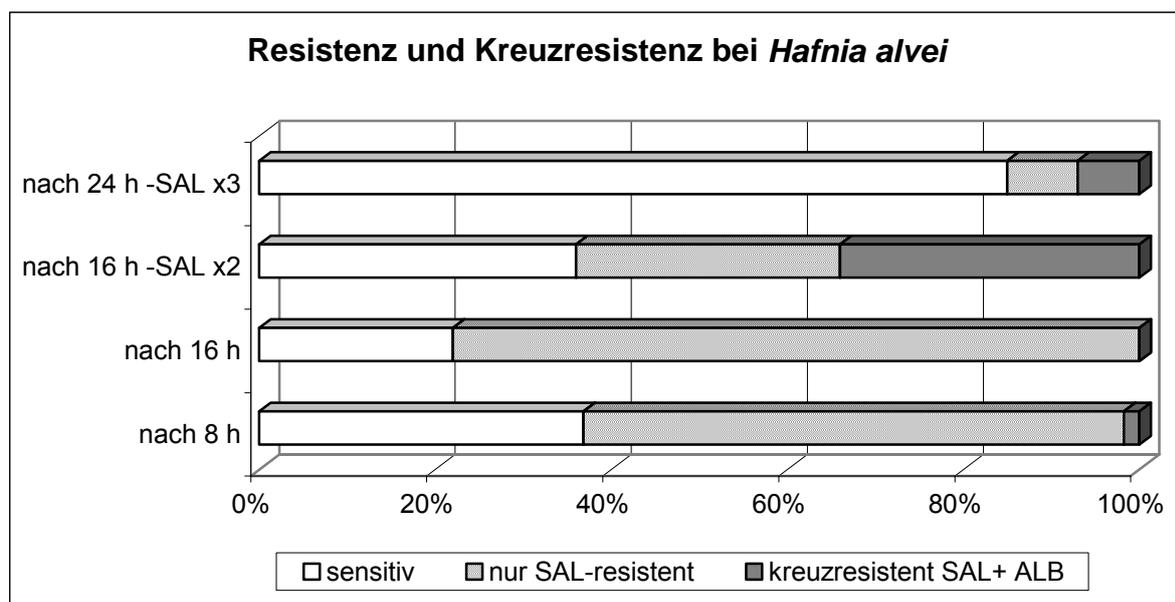
Wie zuvor wurde die Überlebensrate der jeweiligen Teststämme errechnet, diesmal unter Einfluss von hydrolysiertem Salmycin. Parallel dazu wurden zu jedem Messpunkt Proben entnommen und das Verhältnis von sensitiven zu resistenten CFU ermittelt. Unter den resistenten Kolonien wurde nochmals zwischen CFU unterschieden, welche nur gegen Salmycin A Resistenz zeigten und CFU mit Kreuzresistenz zu Albomycin. Der Vergleich der Überlebensraten unter Einfluss von frischem und hydrolysiertem Salmycin zeigt, dass bereits innerhalb der ersten acht Stunden Inkubation bedeutende Unterschiede in den Zellzahlen auftreten (vgl. Tab. C-VIII und C-IX).

**Tab. C-IX :** Überlebensrate der untersuchten Gram-negativen Pathogene (100 µl Volumen NB+D-Medium,  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt; SAL-Konzentration 100 µg/ml, Kontrolle: PBS).

	<b>cfu/ml nach 8 h SAL<sub>hydr.</sub> / Kontrolle</b>	<b>cfu/ml nach 16 h SAL<sub>hydr.</sub> / Kontrolle</b>
<i>Hafnia alvei</i> (5064)	$4,5 \times 10^4 / 5,7 \times 10^5$ <b>Anteil: 7,89 %</b>	$2,1 \times 10^7 / 1,9 \times 10^7$ <b>Anteil: 91,30 %</b>
<i>Enterobacter cloacae</i> (0607)	$3,8 \times 10^6 / 2,0 \times 10^8$ <b>Anteil: 1,9 %</b>	<b>n.a.</b>
<i>K. pneumoniae</i> (2164)	$5,3 \times 10^6 / 1,6 \times 10^8$ <b>Anteil: 3,31 %</b>	$5,66 \times 10^8 / 1,9 \times 10^8$ <b>Anteil: 297,89 %</b>

In Ansätzen, die mit hydrolysiertem Salmycin inkubiert wurden, sind weitaus höhere CFU zu finden. Nach 16 Stunden Inkubation ist der hemmende Effekt der Substanz bei *H. alvei* nahezu aufgehoben (CFU 91,3% der Negativkontrolle), in den Ansätzen von *K. pneumoniae* sind fast dreimal mehr CFU zu finden als in der Negativkontrolle. Aus den Ergebnissen lässt sich schliessen, dass das hydrolysierte Salmycin nicht nur seinen antibiotischen Effekt verliert, sondern zudem wachstumsfördernde Wirkung zu besitzt.

Nach acht Stunden Inkubation konnte für *Hafnia alvei* eine Überlebenszahl von  $4,5 \times 10^4$  cfu/ml ermittelt werden, während es nach 16 Stunden bereits etwa  $2,1 \times 10^7$  cfu/ml waren. Bei zweimaliger Salmycingabe konnten nach 24 Stunden Inkubation rund  $2 \times 10^8$  cfu/ml ausgezählt werden. Damit lagen sie bereits nach acht Stunden um annähernd das 30fache über der Zellzahl unter Einfluss von frischem Salmycin. Nach 16 Stunden lagen bereits vier, nach 24 Stunden nahezu fünf Zehnerpotenzen zwischen den Vergleichswerten (vgl. Tab C-VIII).

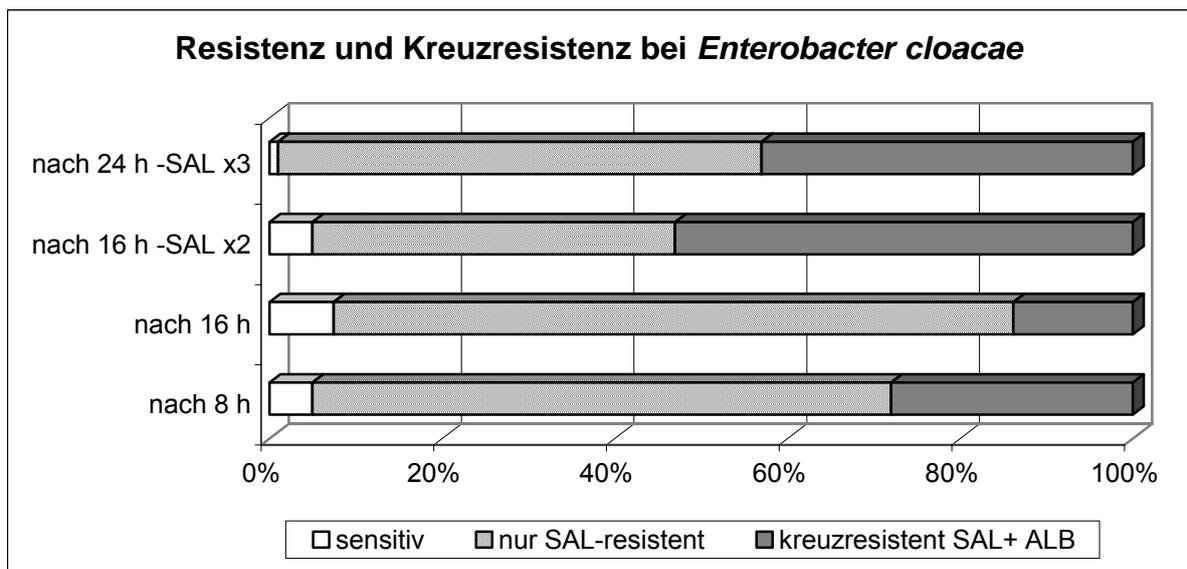


(Angaben in %)	sensitiv	nur SAL <sup>R</sup>	SAL <sup>R</sup> /ALB <sup>R</sup>	R <sub>gesamt</sub>
<b>8 h</b>	35	63,2	1,8	65
<b>16 h</b>	22	78	0	78
<b>16 h SAL x2</b>	36	30	34	64
<b>24 h SAL x3</b>	85	8	7	15

**Abb. C30** : Verhältnis von sensitiven zu resistenten Zellen bei *Hafnia alvei* (5046); n= 3x100 ausser 8 h-Wert [57], getestet auf NB +220 µM DPD). SAL x2= Salmycin A -Gaben bei t=0 h und t=8 h, SAL x3= Salmycin A-Gaben bei 0h, 8 h und 16 h.

Die Analyse der CFU von *H. alvei* (Abb. C30) zeigt, dass eine einfache Gabe zunächst eine Zunahme der resistenten Kolonien bewirkt. Im Zeitraum von null bis 16 Stunden werden hauptsächlich CFU gezählt, welche lediglich Salmycinresistenz aufweisen. Wird mehrfach Salmycin A zugeführt, steigt die Zahl der kreuzresistenten Mutanten an. Möglicherweise wurden gezielt Transportmutanten selektiert. Das Auftreten einer hohen Anzahl sensibler Keime nach 24 Stunden Inkubation ist möglicherweise die Folge daraus, dass ins Medium sekretierte Enzyme zwischenzeitlich das Salmycin inaktiviert haben und eine vitalere (sensitive) Population die resistente Variante abgelöst hat. Mit hoher Wahrscheinlichkeit trägt die geringe Teilungsrate von *H. alvei* zu dem beobachtenden Effekt bei.

Die Auswertung von *Enterobacter cloacae* erwies sich als schwierig, da auf den Platten mit den Verdünnungen  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  ein rasches Wachstum stattfand, welches die Kolonien ineinander fließen liess. In höheren Verdünnungen konnten nur vereinzelte Kolonien gepickt werden, die jedoch stets auf einem schmierigen Hauch winziger Kolonien wuchsen.

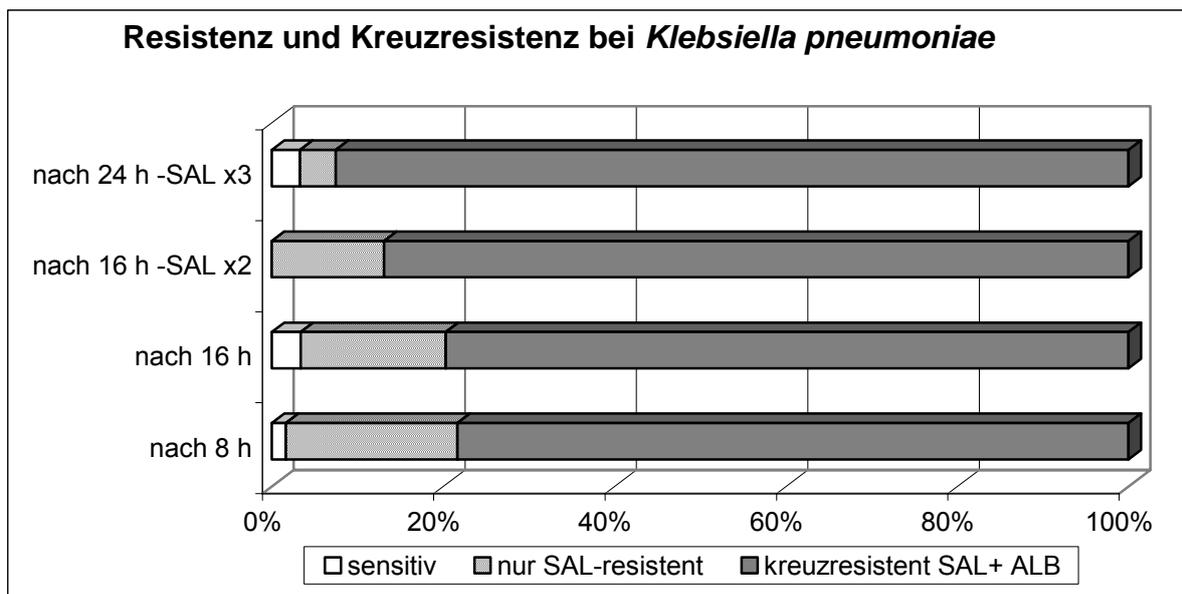


(Angaben in %)	<b>sensitiv</b>	<b>nur SAL<sup>R</sup></b>	<b>SAL<sup>R</sup>/ALB<sup>R</sup></b>	<b>R<sub>gesamt</sub></b>
<b>8 h</b>	5	67	28	95
<b>16 h</b>	7	80	13	93
<b>16 h SAL x2</b>	5	42	53	95
<b>24 h SAL x3</b>	1	56	43	99

**Abb. C31** : Verhältnis von sensiblen und resistenten Zellen bei *Enterobacter cloacae* 0607; getestet auf NB +220 µM DPD, n=4x100

Eine Isolierung erwies sich daher als äusserst schwer und die ermittelte Zahl von  $3,8 \times 10^6$  cfu/ml nach acht Stunden muss als unsicher gewertet werden. Sie ist durch (s. Abb. C31) visuelle Auswertung des Wachstums von *Enterobacter* nicht zu bestätigen. Daher fliessen die Daten von *Ent. cloacae* nicht in die Auswertung der Überlebensraten ein. Die Analyse der CFU von *Ent. cloacae* zeigt eindeutig eine nahezu vollständige Resistenzbildung. Kreuzresistente Mutanten treten erst im späteren Verlauf auf. Die Versuchsreihe aus C.4.2. zeigte, das *Hafnia alvei* sogar noch von teilhydrolysiertem Salmycin gehemmt wird (Abb. C21).

Nach acht Stunden betrug bei *Klebsiella pneumoniae* die Anzahl der gezählten cfu/ml etwa  $5,3 \times 10^6$ , nach 16 h  $5,66 \times 10^8$  cfu/ml. Diese Werte liegen um vier bis sechs Zehnerpotenzen über der Überlebensrate bei frischem Salmycin A. Die Daten zur Ausbildung von Resistenzen zeigen bereits nach acht Stunden eine nahezu vollständig ausgeprägte Unempfindlichkeit gegen Salmycin. Das Verhältnis von Einzelresistenz zu Kreuzresistenz mit Albomycin erhöht sich kontinuierlich über die Dauer der Messung (vgl. Abb C32).



(Angaben in %)	sensitiv	nur SAL <sup>R</sup>	SAL <sup>R</sup> /ALB <sup>R</sup>	R <sub>gesamt</sub>
<b>8 h</b>	3	19	78	97
<b>16 h</b>	4	18	78	96
<b>16 h SAL x2</b>	0	12	88	100
<b>24 h SAL x3</b>	3	4,5	92,5	97

Abb. C32 : Verhältnis von sensitiven und resistenten Zellen bei *Klebsiella pneumoniae* 2164 (je 120 ausgezählte Kolonien, auf NB-Medium +200 µM DPD), n=4x120.

Der Vergleich aller drei Spezies aus der Familie *Enterobacteriaceae* hinsichtlich der Entwicklung einer Salmycinresistenz weist darauf hin, dass unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können, welche sich teilweise überlagern. So könnte bei *Enterobacter cloacae* eine enzymatische Inaktivierung der Substanz in Frage kommen, da das Bakterium sowohl bei Verwendung von Salmycin A, als auch bei hydrolysiertem Salmycin Wachstumsverläufe aufweist, die sich nahe der Werte der Negativkontrolle bewegt. Als sekundäre Folge kommt es dann zu einer transportabhängigen Resistenz. Bei *Klebsiella pneumoniae* ist eine transportabhängige Resistenz das primäre Ereignis. Salmycin A hemmt das Wachstum dieser Art sehr effektiv, hydrolysiertes Salmycin dagegen fördert durch Zuführung von Eisen das Wachstum und die Entstehung von Resistenzen.

### **C.5.2. Resistenzentwicklung bei *Staphylococcus aureus***

Stellvertretend für Gram-positive Organismen wurden verschiedene *S. aureus*-Stämme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Tendenz zur Resistenzbildung untersucht. Hierbei wurde in identischer Weise wie bei den Gram-negativen Teststämmen verfahren.

#### **C.5.2.1. Überlebensrate von *S. aureus* unter Einfluss von Salmycin A**

Zunächst wurde die Anzahl der überlebenden Bakterien ausgezählt, die nach acht, 12 und 16 Stunden in einem Ansatz mit frisch gelöstem Salmycin nachweisbar waren. Entgegen den Werten der Gram-negativen Keime, konnte bei den *S. aureus*-Testreihen stets eine sinkende Tendenz in den ermittelten CFU-Werten beobachtet werden (siehe Tab. C-X). Nach 16 Stunden Inkubation mit Salmycin war kein Wachstum mehr auf den Testplatten von RN6390 und Mu50 erkennbar. Auch beim Stamm COL sank die Anzahl der überlebenden Zellen kontinuierlich.

**Tab. C-X :** Ausgezählte cfu/ml verschiedener *S. aureus*-Stämme inkubiert unter Salmycin-Zugabe (NB-Medium + 200µM DPD mit 50 µg/ml Salmycin A).

<b>Stamm</b>	<b>8 h</b>	<b>12 h</b>	<b>16 h</b>
<i>RN6390</i>	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	0
<i>COL</i>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$5 \times 10^3$
<i>Mu50</i>	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	0

### **C.5.2.2 Resistenzraten von *S. aureus***

Das Patientenisolat VA24500 entwickelte am raschesten eine Resistenz und zeigte die schnellste Wachstumsrate. Nach acht Stunden konnten  $1,4 \times 10^7$  cfu/ml für Salmycin A ermittelt werden, nach 16 h bereits wies rund  $2,7 \times 10^8$  cfu/ml. Damit übertraf das Isolat den Laborstamm um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Im Ansatz von RN6390 konnten nach acht Stunden  $6 \times 10^5$  cfu/ml ausgezählt werden, nach 16 h  $2,1 \times 10^7$  cfu/ml.

Parallel dazu wurde die Zahl überlebender Keime in einem Ansatz von RN6390 mit Albomycin untersucht. Hier wurden nach acht Stunden  $1,1 \times 10^6$  cfu/ml gezählt, nach 16 Stunden  $1,64 \times 10^8$  cfu/ml. Damit liegt Albomycin zwischen den beiden von Salmycin A ermittelten Werten.

Alle getesteten Isolate aus acht, 16 und 24 Stunden wiesen zu 100 % eine Resistenz gegen Salmycin A und Kreuzresistenz zu Albomycin auf. Getestet wurden in jeder Versuchsreihe 100 Kolonien. Damit zeigten *S. aureus* RN6390 als auch VA24500 die schnellste Anpassung an das Antibiotikum und das höchste beobachtete Maß auftretender Resistenz durch teilhydrolysiertes Salmycin.

## **C.6. Hydroxamat-Aufnahmesysteme als Salmycin-Transporter**

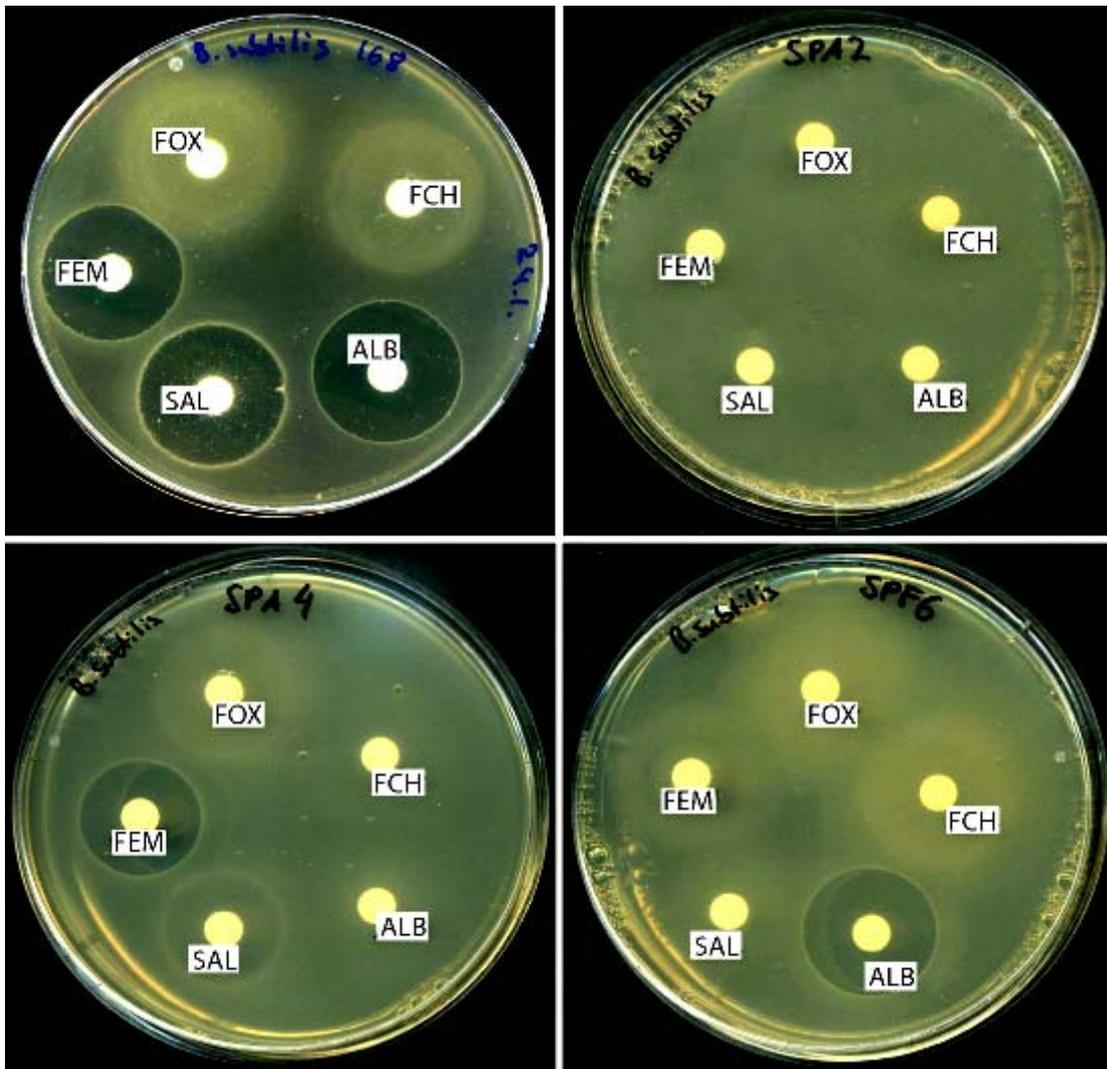
Aufgrund der homologen Struktur zu Hydroxamat-Siderophoren, lag eine Aufnahme von Salmycin durch ein Hydroxamat-Transportsystem nahe. Da bei Gram-negativen Keimen neben enzymatischen offenbar auch andere Faktoren die Resistenz gegen Salmycin beeinflussen, wurden zur Verifizierung des Aufnahmesystems transportdefiziente Mutanten von *B. subtilis* und *S. aureus* untersucht.

### **C.6.1. Salmycin-Aufnahme bei *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* ist in der Lage, drei Hydroxamat-Siderophore aufzunehmen: Ferrichrom, Ferrioxamin und Shizokinen. Das Fhu-System dieses Bakteriums wurde von Schneider und Hantke (1993) beschrieben. Die durch ungerichtete *Tn917lac*-Insertion hergestellten *B. subtilis*-Mutanten mit Defekten im Hydroxamataufnahmesystem wurden in dieser Arbeit auf ihren Phänotyp hinsichtlich ihrer Sensitivität gegen Salmycin, Albomycin und Ferrimycin getestet (siehe Abb. C33).

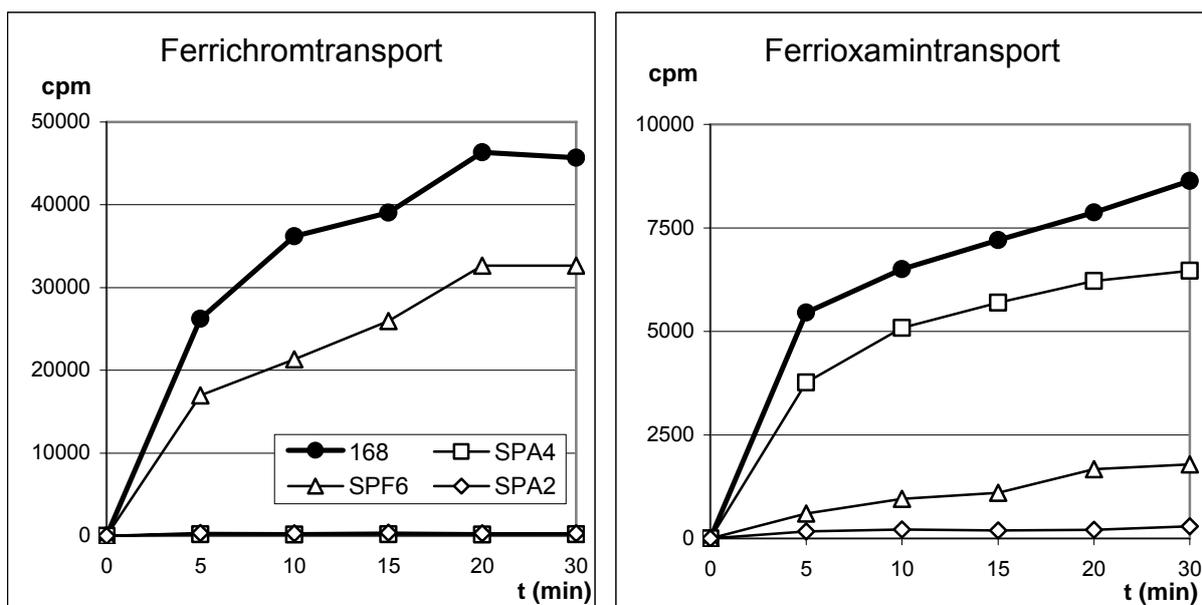
**Tab. C-XI** : Zusammenstellung der von Mutationen betroffenen Proteine des Hydroxamat-transportsystems von *B. subtilis* und daraus resultierender Phänotyp. FCH = Ferrichrom, FOX = Ferrioxamin, SAL = Salmycin A, FEM = Ferrimycin, ALB = Albomycin.

	Vorhandene Komponenten des Hydroxamat-aufnahmesystems			Aufnahme		Sensitivität		
	FhuBC	FhuD	YxeB („FoxD“)	FCH	FOX	SAL	FEM	ALB
<b>168</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SPA2</b>	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>SPA4</b>	+	-	+	-	+	+	+	-
<b>SPF6</b>	+	+	-	+	-	-	-	+



**Abb. C33** : *B. subtilis*-Mutanten im Plattendiffusionstest. Ferrioxamin [FOX], Ferrichrom [FCH], Salmycin A [SAL], Albomycin [ALB] je 10 µg Substanz, Ferrimycin [FEM] 15 µg. (NB-Medium + 200 µM Dipyridyl), n=3.

Dabei verhielten sich die Mutanten je nach betroffenem Gen unterschiedlich. Erwartungsgemäss zeigte der Stamm SPA2, mit einer Transposoninsertion im Membrankomplex (FhuBC), einen völligen Ausfall des Siderophortransportes. Dies hatte eine vollständige Resistenz gegen Salmycin A und B, Ferrimycin und Albomycin zur Folge. Sind die mit einem Lipidanteil in der Membran verankerten Bindeproteine von einer funktionellen Mutation betroffen, ändert sich das Aufnahmeverhalten von Hydroxamatsiderophoren und die Empfindlichkeit der Mutante gegen Sideromycine. Ein Ausschalten von *fhuD* verhindert die Aufnahme von Ferrichrom und des dazu homologen Albomycins. Die Mutante SPA4 ist daher gegen Albomycin resistent, zeigt aber weiterhin Sensitivität gegen Salmycin und Ferrimycin. Die Mutante SPF6 besitzt dagegen eine *Tn917*-Insertion im Gen *yxkB* („*foxD*“), welches als zweites periplasmatisches Bindeprotein identifiziert wurde (Schneider & Hantke, 1993). Im Phänotyp zeigt sie Resistenz gegen beide Antibiotika. Sie nimmt weiterhin in geringerem Maße Ferrioxamin auf. Es konnte bestätigt werden, dass Salmycin durch aktiven Transports über das Hydroxamataufnahmesystem in die bakterielle Zelle gelangt. Um die Unterschiede in der Siderophoraufnahme der Mutanten quantitativ zu erfassen, wurden Transportassays mit radioaktiv markiertem Ferrichrom bzw. Ferrioxamin durchgeführt (siehe Abb. C34). Die Transportversuche bestätigen die Beobachtungen aus den Plattendiffusions-Assays. Die Mutante SPA2 zeigt für beide Siderophoren keinen Transport.



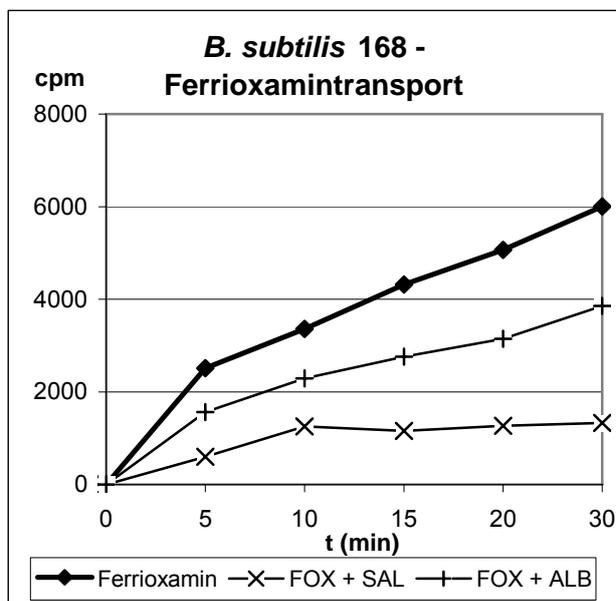
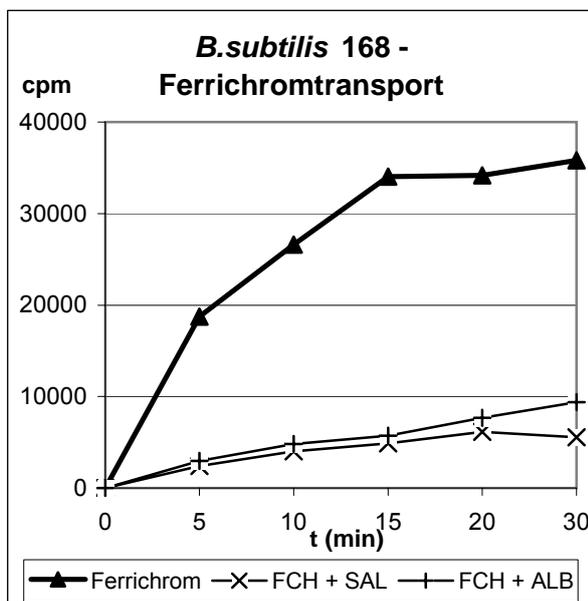
**Abb. C34** : Transport-Assay der *B. subtilis*-Mutanten mit  $^{55}\text{Fe}$ -markiertem Ferrichrom bzw. Ferrioxamin. Dargestellt ist die Siderophoraufnahme über 30 min, n=3.

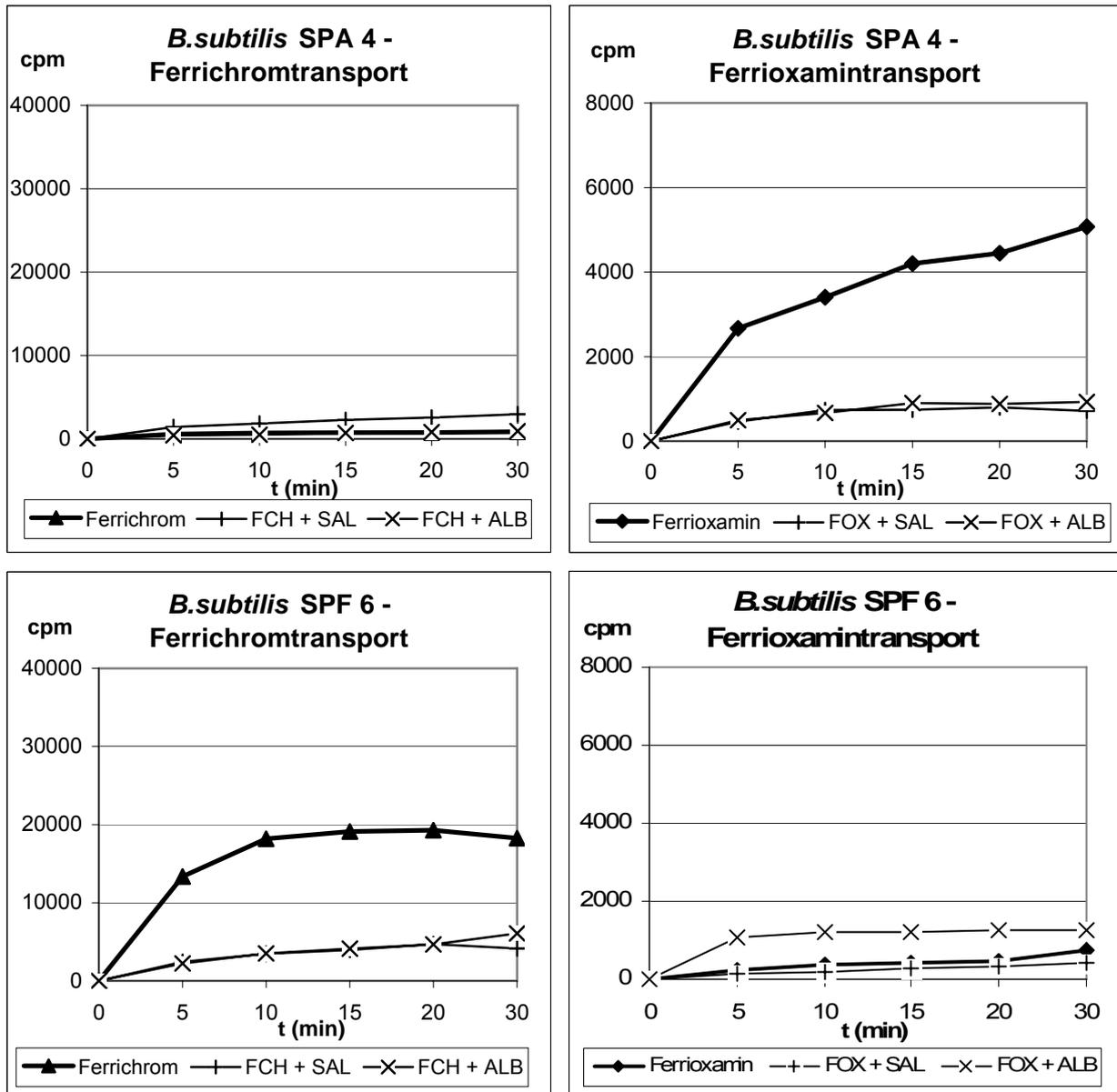
Die Mutante mit einer FhuD-Deletion (SPA4) ist nicht fähig, Ferrichrom aufzunehmen. Sie zeigt beim Ferrioxamin-Transport jedoch eine Rate, die sich der des Wildtyps stark annähert (75 und 79 % in den letzten beiden Messpunkten).

Dagegen zeigt die Messung der YxeB-Mutante SPF6 einen deutlichen – im Vergleich zum Wildtyp leicht verringerten – Ferrichromtransport. SPF6 ist jedoch auch in der Lage, einen Teil des Ferrioxamins zu transportieren. Die Rate sinkt im Vergleich auf ein Fünftel des Wildtyp-Wertes (21% in den letzten Messpunkten; siehe Abb. C35).

In einer zweiten Messreihe sollte nun bestätigt werden, dass Salmycin tatsächlich über dieses Hydroxamat-Aufnahmesystem in die Zelle transportiert wird. Ein direkter Nachweis war nicht durchführbar, da eine radioaktive Markierung von Salmycin nach gängigem Protokoll nicht möglich war (siehe B.2.3.7.). Somit wurde ein indirekter Nachweis geführt, indem Salmycin A als kompetitives Substrat zum Transportansatz von Ferrioxamin bzw. Ferrichrom hinzugefügt wurde. Eine Verringerung der gemessenen Transportrate lässt hierbei auf Verdrängung des <sup>55</sup>Fe-markierten Substrates durch das Sideromycin schliessen.

Die Werte zeigen das der Ferrichromtransport des Wildtyps von der Salmycinzugabe nicht beeinflusst wird, die Transportrate von Ferrioxamin jedoch sehr stark abfällt. Auch die Zugabe von Albomycin stört den Ferrioxamintransport, wenn auch in geringerem Maße.





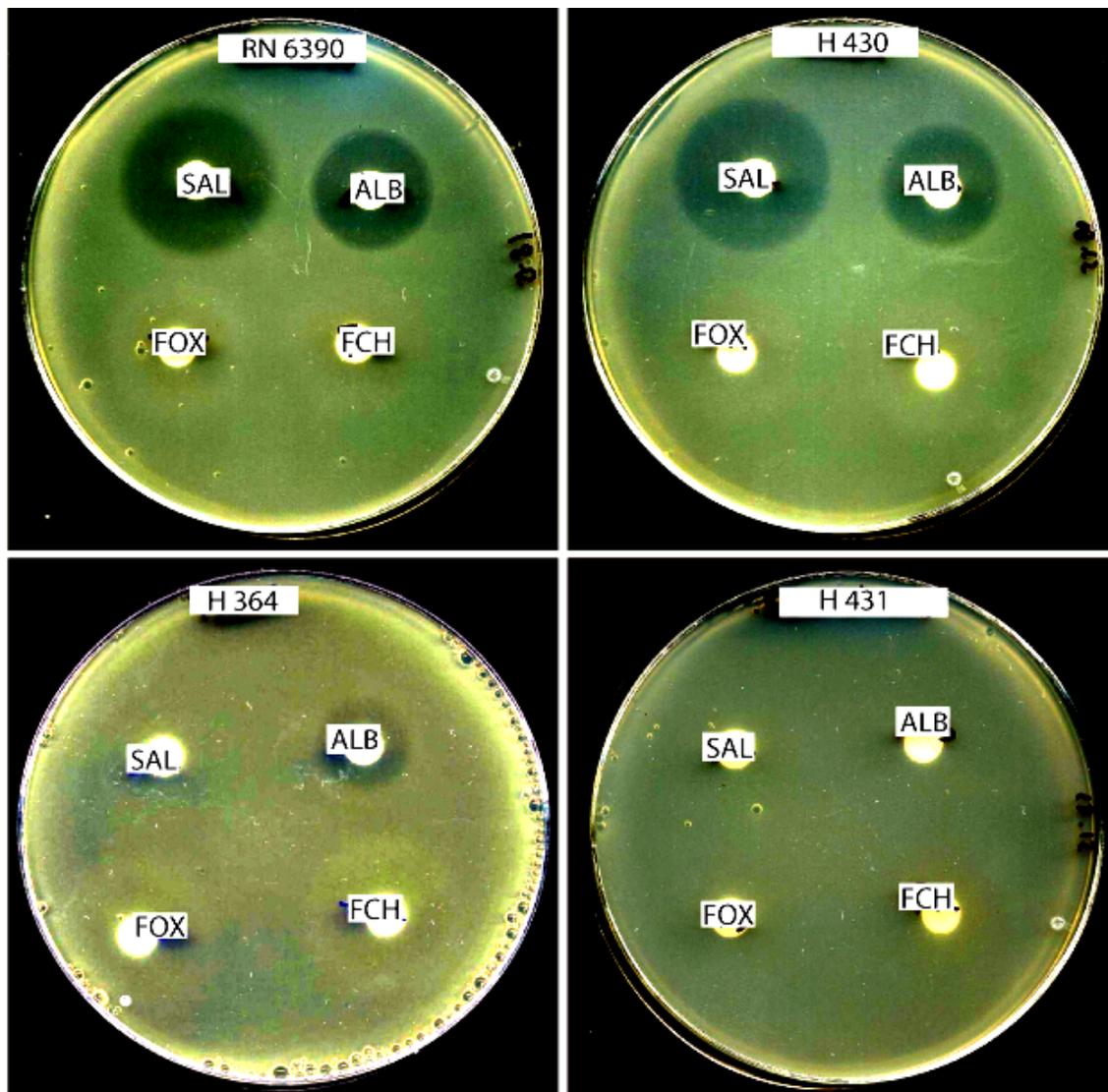
**Abb. C35** : Kompetitiver Transport-Assay der *B. subtilis*-Mutanten mit  $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -markiertem Ferrichrom bzw. Ferrioxamin und Salmycin. Dargestellt ist die Veränderung der Siderophoraufnahme über 30 min. Probenvolumen 50  $\mu\text{l}$ , spez. Aktivität je Probe: 13,6  $\mu\text{l}$ , Verhältnis radioaktiv markiertes Siderophor zu kompetitivem Sideromycin 1:1,3. FCH =  $^{55}\text{Fe}$ -Ferrichrom, FOX =  $^{55}\text{Fe}$ -Ferrioxamin, SAL = Salmycin A, ALB = Albomycin, n=3.

Die Mutante SPA4 ist lediglich in der Lage Ferrioxamin zu transportieren. Daher wird der Transport des radioaktiven Substrats von den Kompetitoren noch stärker beeinflusst als es beim Wildtyp der Fall ist (Abb. C35, mitte rechts). Das Diagramm verdeutlicht zudem, dass das Bindeprotein YxeB („FoxD“) nicht spezifisch Ferrioxamin bindet und auch von Albomycin besetzt werden kann. Dieser Umstand kann auch im Vergleich von SPF6 mit dem Wildtyp beobachtet werden: die Transportrate von Ferrichrom in die Mutante ohne Ferrioxamin-bindendes Protein erreicht nicht die Höhe der Wildtyp-Transportrate. Die Transportrate von SPF6 ist in Kombination von

Ferrioxamin mit Albomycin am höchsten. Die weist darauf hin, dass zu einem geringen Prozentsatz radioaktives Eisen zwischen den Substraten ausgetauscht wird.

### C.6.2. Salmycin-Aufnahme bei *S. aureus*: das FhuCBG-Operon

Wie *B. subtilis* besitzt auch *S. aureus* ein Fhu-System zur Hydroxamataufnahme. Dieses wurde in den vergangenen sechs Jahren bereits eingehend untersucht (Heinrichs et al., 2000, 2001). Einige der im Labor Heinrich hergestellten Deletionsmutanten der Bindeproteine FhuD1 und FhuD2 standen für die Untersuchung der Salmycinaufnahme zur Verfügung (s. Abb. C36).

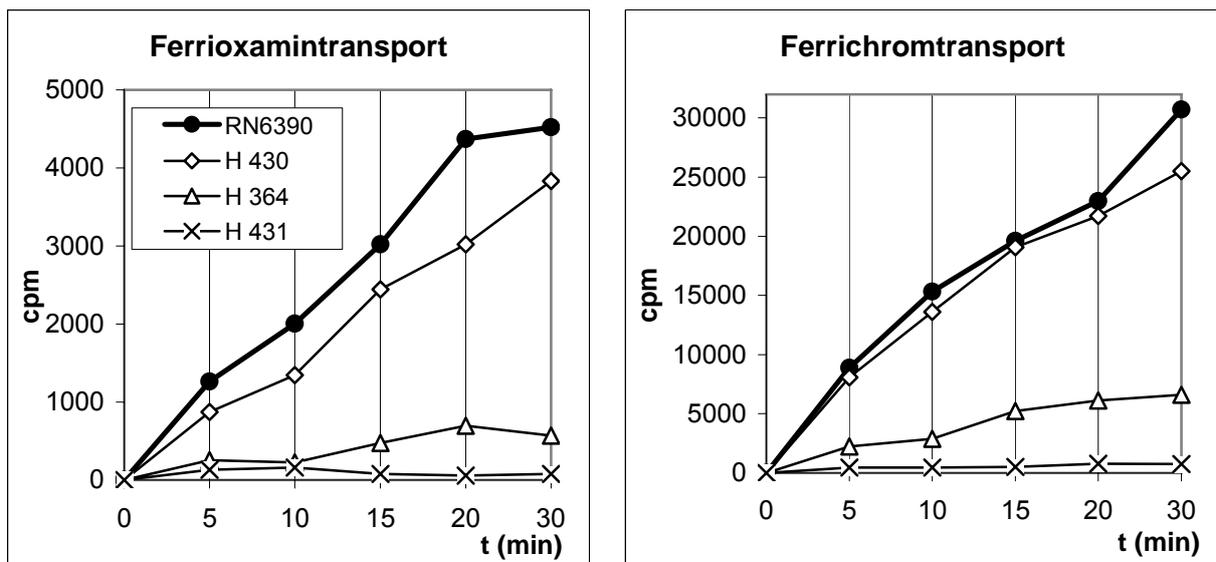


**Abb. C36** : *S. aureus* FhuD-Mutanten im Plattendiffusionstest. Ferrioxamin [FOX], Ferrichrom [FCH], Salmycin A [SAL], je 10 µg Substanz, Albomycin [ALB] 5 µg. (NB-Medium + 200 µM Dipyridyl), n=4.

**Tab. C-XII** : Zusammenstellung der Deletionsmutanten der Bindeproteine FhuD1 und FhuD2 von *S. aureus* und daraus resultierender Phänotyp (entsprechend Abb. 36)..

	Vorhandene Bindeproteine		Siderophoraufnahme		Sensitivität	
	FhuD1	FhuD2	FOX	FCH	SAL	ALB
<b>RN 6390</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>H 430</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>H 364</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>(+)</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>(+)</b>
<b>H 431</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Parallel zur Versuchsreihe von *B. subtilis* wurde Sensitivität und Aufnahme von Salmycin und Albomycin untersucht. Wie bei *B. subtilis* wurden im Anschluss Transportassays mit radioaktiv markiertem Ferrichrom und Ferrioxamin durchgeführt, um die Aufnahme von Hydroxamatsiderophoren quantitativ zu erfassen (s. Abb. C37).



**Abb. C37 :** Transport-Assay der *S. aureus*-Mutanten mit  $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -markiertem Ferrichrom bzw. Ferrioxamin. Dargestellt ist die Siderophoraufnahme über 30 min. Probenvolumen 50  $\mu\text{l}$ , eingesetzte Aktivität: 13,6 kBq je Probe, n=3.

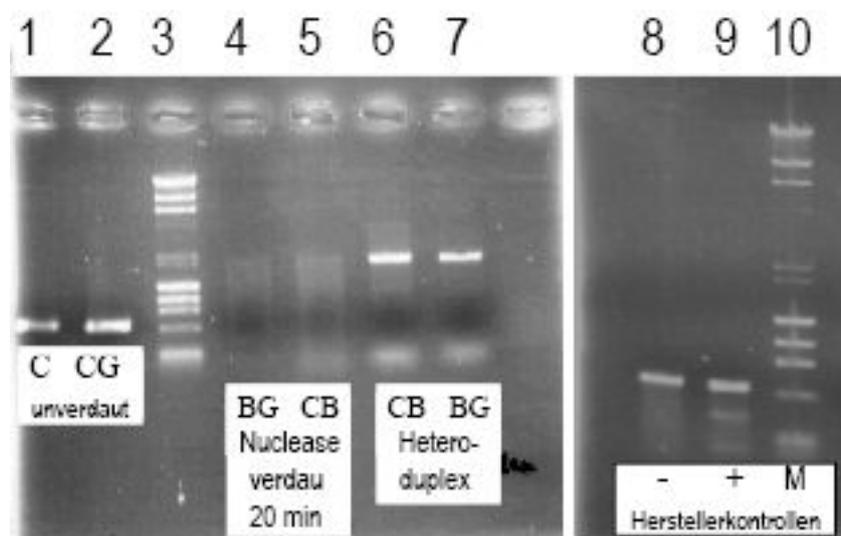
### C.6.3. Untersuchungen zur aufnahmebedingten Resistenzbildung bei *S. aureus*

Im Lauf der vorangegangenen Untersuchungen zur Bestimmung der Resistenzhäufigkeit wurden insgesamt mehr als 500 resistente Kolonien aus Salmycin-Hemmhöfen isoliert. Über 99 % der Isolate zeigten im Sensitivitätstest stets Kreuzresistenz zu Albomycin. Der Phänotyp wies dadurch bereits auf einen Defekt im

Aufnahmesystem hin. Die Sequenzierung des Fhu-Systems einiger resistenter Isolate sollte Aufschluss darüber geben.

### C.6.3.1. Mutationsdetektion mit dem Surveyor® Kit

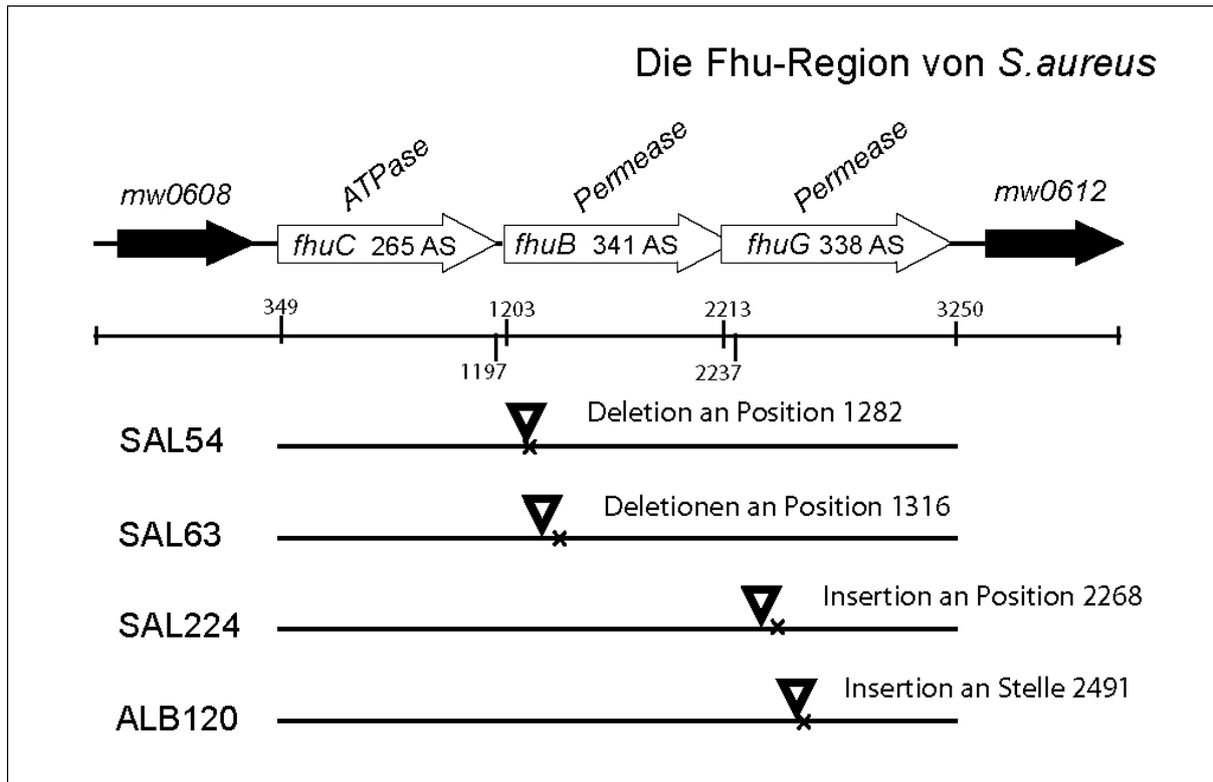
Um die Sequenzierung des 2,96 kb grossen Fhu-Operons von *S. aureus* zu beschleunigen, wurde eine Detektion der Mutationen in den einzelnen Proteinen angestrebt. Hierfür wurde das Mutation Detection Kit® von EpiCentre/Transgenomic verwendet. Trotz zahlreicher Versuche und Variation des Protokolls, konnte – bis auf eine einwandfreie Positiv- und Negativkontrolle – kein auswertbares Resultat erbracht werden (vgl. Abb. C38).



**Abb. C38 :** (a) Verdau von *S. aureus*-DNA, Sequenzabschnitt FhuCB und FhuBG. Von links nach rechts: unverdaute DNA (1 + 2), Marker (M, 3 + 10), Nucleaseverdau (4 + 5), Heteroduplex bei nichtverdauter Kontrolle (6 + 7); (b) Verdau der Negativ- (8) und Positivkontrolle (9).

### C.6.3.2. Mutationen im Membrankomplex

Für die Analyse der in dieser Arbeit isolierten spontan resistenten *S. aureus*-Isolate wurde das 2,96 kb grosse Fhu-Operon in sechs Unterabschnitte gegliedert und mit Primern amplifiziert. Jede Sequenz wurde je zweimal in forward- und reverse-Richtung sequenziert und mit der Datenbanksequenz (MW2, Eintrag NC003923) verglichen.



**Abb. C39 :** (oben) Schema des fhu-Operons von *S. aureus* (*mw0609 – mw0611* im sequenzierten Genom von MW2). FhuD2 befindet sich weit entfernt stromabwärts (*mw2202*). FhuD1 ist bei versch. Stämmen an wechselnden Loci zu finden (*mw1945*) oder fehlt ganz. (unten) Lage der identifizierten Mutationen bei RN6390-Derivaten.

Die Analyse ergab bei vier untersuchten kreuzresistenten Mutanten Insertionen oder Deletionen in den Genen *fhuB* und *fhuG*, die zum vorzeitigen Abbruch der Translation und zu inaktiven Proteinfragmenten führen (siehe Abb. C39 - C41). Drei der vier Isolate besitzen Mutationen innerhalb der ersten 100 Basenpaare des betroffenen Proteins, eine innerhalb der ersten 300 Basenpaare. Bei SAL54 und SAL63 konnten Deletionen einzelner Nukleotide identifiziert werden.

	1261		1281		1301
RN6390	tgaagttttt	atcctatatt	ataggtttta	gtagatgact	actaatcaca ctattttatt
SAL54	tgaagttttt	atcctatatt	a AGGTTTAA		
SAL63	tgaagttttt	atcctatatt	aTAGGTTTAA	gtagatgact	actaatcaca ctatt AT T
RN6390	L K F L	S Y I	I G L	S M I L	L I T L F I
SAL54	L K F L	S Y I	K V *		
SAL63	L K F L	S Y I	I G L	S M I L	L I T L L F
	1321		1341		1361
RN6390	ctacattaat	aggtgacgcc	aaaattcaag	cctctacaat	tatagaggct atttttaatt
SAL63	CTACATTAAT	AGGTGA			
RN6390	S T L I	G D A	K I Q	A S T I	I E A I F N
SAL63	Y I N	K *			

**Abb. 40:** DNA- und Proteinsequenz innerhalb von *fhuB*/FhuB. Dargestellt sind der Stamm *S. aureus* RN6390 und dessen Derivate im mutierten Bereich.

Sie betreffen das Gen *fhuB*, welches für einen membranständiges Transportprotein (341 AS) codiert. SAL54 besitzt eine T-Deletion an Position 1282. Bei SAL63 konnten zwei kurz hintereinander auftretende Deletionen an Position 1316 und 1319 gefunden werden. Durch den veränderten Leserahmen wird bei SAL54 ein Proteinfragmente von lediglich 28 Aminosäuren (Länge der nativen Sequenz: 26 AS), bei SAL63 ein Fragment von 43 Aminosäuren (Länge der nativen Sequenz: 37 AS) ohne Funktionalität gebildet.

	2221		2241		2261															
RN6390	gaggacgctc	aatatg	gatta gttcaaataa	taaacgcaga	caattgatag cactggctgt															
ALB120	gaggacgctc	aatatg	gatta gttcaaataa	taaacgcaga	caattgatag cactggctgt															
SAL224	gaggacgctc	aatatg	gatta gttcaaataa	taaacgcaga	caattgaATAGCACTGGCTGT															
RN6390	R	T	L	N	M	I	S	S	N	N	K	R	R	Q	L	I	A	L	A	V
ALB120	R	T	L	N	M	I	S	S	N	N	K	R	R	Q	L	I	A	L	A	V
SAL224	R	T	L	N	M	I	S	S	N	N	K	R	R	Q	L	N	S	T	G	C
	2281		2301		2321															
RN6390	tttttagcatt	ctactatttc	taggttg	tac ttggagtatt	acctcagg	tg aatacaacat														
ALB120	tttttagcatt	ctactatttc	taggttg	tac ttggagtatt	acctcagg	tg aatacaacat														
SAL224	TTTTTAGCATT																			
RN6390	F	S	I	L	L	F	L	G	C	T	W	S	I	T	S	G	E	Y	N	I
ALB120	F	S	I	L	L	F	L	G	C	T	W	S	I	T	S	G	E	Y	N	I
SAL224	F	*																		
	2341		2361		2381															
RN6390	acctgttgaa	agatttttca	aaactttaat	tggacaaggt	gatgccattg	atgagttaat														
ALB120	acctgttgaa	agatttttca	aaactttaat	tggacaaggt	gatgccattg	atgagttaat														
RN6390	P	V	E	R	F	F	K	T	L	I	G	Q	G	D	A	I	D	E	L	I
ALB120	P	V	E	R	F	F	K	T	L	I	G	Q	G	D	A	I	D	E	L	I
	2401		2421		2441															
RN6390	cttattagat	ttcaggttac	ctcggatgat	gattactatt	ttggctggcg	cagcgcttag														
ALB120	cttattagat	ttcaggttac	ctcggatgat	gattactatt	ttggctggcg	cagcgcttag														
RN6390	L	L	D	F	R	L	P	R	M	M	I	T	I	L	A	G	A	A	L	S
ALB120	L	L	D	F	R	L	P	R	M	M	I	T	I	L	A	G	A	A	L	S
	2461		2481		2501															
RN6390	tattagtgg	gcaatag	tg gcaatag	tg aaagtgtcac	aaaaaatcca	atagctgaac caggtatatt														
ALB120	tattagtgg	gcaatag	tg gcaatag	tg aaagtgtcac	AAAAAATCCA	ATAGCTGAAC														
RN6390	I	S	G	A	I	V	Q	S	V	T	K	N	P	I	A	E	P	G	I	L
ALB120	I	S	G	A	I	V	Q	S	V	T	K	K	S	N	S	*				

**Abb. 41:** DNA- und Proteinsequenz innerhalb von *fhuG*/*FhuG*. Dargestellt sind der Stamm *S.aureus* RN6390 und dessen Derivate im mutierten Bereich.

In den beiden Isolaten SAL224 und ALB120 konnten Punktmutationen in *fhuG* nachgewiesen werden. Hier führte die Insertion eines Adenosins in den Positionen 2268 (SAL224) und 2491 (ALB120) zur Verschiebung des Leserasters. Dadurch entstehen lediglich kurze Peptide ohne Funktion: 17 Aminosäuren (davon 11 nativ) bei SAL224, 90 Aminosäuren (86 davon nativ) bei ALB120.

### C.6.3.3. Mutationen im Bindeprotein

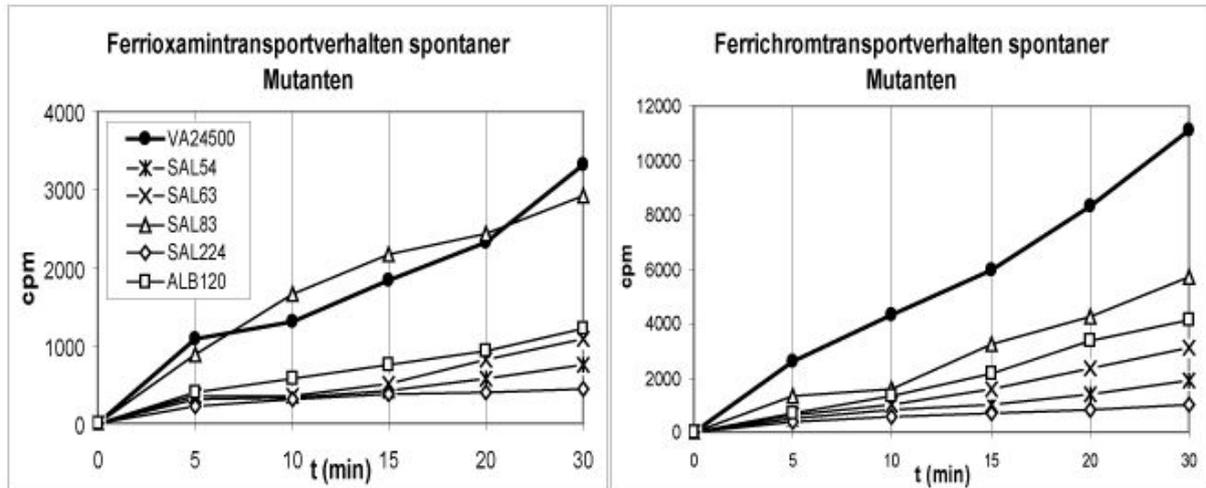
Das Isolat SAL83 zeigt im Bioassay Salmycinresistenz, besitzt jedoch noch Sensitivität gegen Albomycin. Bei SAL83 konnte kein Defekt in FhuCBG nachgewiesen werden. Daher wurden die Bindeproteine FhuD1 und FhuD2 sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass das Isolat SAL83 in FhuD2 eine Deletion von 10 Nukleotiden im C-Terminus (Position 841 bis 851; vgl. Abb. C42) besitzt. Dies führt zu einer Verkürzung des Proteins von 302 auf 279 nativen und fünf missense-Aminosäuren. Hierdurch scheint eine Faltung in die reife Form nicht mehr gewährleistet.

	790	800	810	820	830	840
RN6390	atgtggaaga	atttgaaagc	tactaaagaa	ggacatattg	ttaaagttga	tgctggtaca
SAL 83	atgtggaaga	atttgaaagc	tactaaagaa	ggacatattg	ttaaagttga	tgctggtaca
RN6390	M W K	N L K A	T K E	G H I	V K V D	A G T
SAL 83	M W K	N L K A	T K E	G H I	V K V D	A G T
	850	860	870	880	890	900
RN6390	tactggtaca	acgadcctta	tacattagat	ttcatgcgta	aagatttaaa	agaaaaatta
SAL 83	-----	acgadcctta	tacattag			
RN6390	Y W Y	N D P Y	T L D	F M R	K D L K	E K L
SAL 83	-----	T I L I H	*			
	910	920				
RN6390	attaaagctg	caaaataa				
RN6390	I K A A K	*				

**Abb. C42** : DNA- und Proteinsequenz innerhalb von fhuD2/FhuD2. Dargestellt ist der N-Terminus von *S.aureus* RN6390 und der salmycinresistenten Mutante SAL83.

Transport-Assays mit radioaktiven Siderophoren bestätigten die Phänotyp-Tests (siehe Abb. 43). Mutationen im Membrankomplex führten zu einem starken Rückgang der Siderophoraufnahme, sowohl bei Ferrioxamin als auch bei Ferrichrom. Die Isolate verhalten sich im Transport beider Siderophore identisch. Interessant ist, dass zumindest bei den zwei Isolaten SAL63 und ALB120 eine Transportrate erreicht wird, die durch unspezifischen Transport nicht ausreichend zu erklären ist. Die Daten könnten darauf hinweisen, dass Ferrichrom auch von anderen Transportsystemen erkannt wird.

Die Mutante SAL83 mit Deletion im Bindeprotein FhuD2 zeigt einen mässig verringerten Transport von Ferrichrom. Der Ferrioxamintransport entspricht nahezu dem Wildtyp (siehe Abb. C43). Die ist insofern erstaunlich, da SAL83 resistent gegen ein Ferrioxamin-Homolog ist. Sofern kein Messfehler vorliegt, ist dieses Verhalten lediglich dadurch zu erklären, dass die Mutante zwar Ferrioxamin als Substrat erkennt, das grössere Salmycinmolekül aufgrund sterischer Veränderungen durch die Mutation in FhuD2 nicht mehr gebunden und an den Membrankomplex transportiert wird.



**Abb. C43 :** Transportverhalten der Salmycin-resistenten Mutanten von *S. aureus*. Transportassay mit  $^{55}\text{Fe}^{3+}$ , Probenvolumen 50  $\mu\text{l}$ , eingesetzte Aktivität: 13,6 kBq je Probe, n=3.

#### C.6.4. Salmycin A und Salmycin B führen zu identischer Resistenzbildung

Salmycin A und Salmycin B zeigen im *in-vitro*-Versuch ein identisches Wirkspektrum. Im Reihenverdünnungstest wurde der Stamm *S. aureus* RN6390 sowohl mit Salmycin A als auch Salmycin B inkubiert. Aus den überwachten Ansätzen wurden resistente Keime ausplattiert und gegen das jeweils andere Salmycin-Derivat, sowie Albomycin getestet. Sämtliche isolierten Kolonien wiesen eine Kreuzresistenz gegenüber den getesteten Sideromycinen auf. Somit konnte bewiesen werden, dass Salmycin A und Salmycin B denselben Membrantransporter nutzen und die auftretenden Resistenzen auf Mutation des Transportkomplexes beruht.

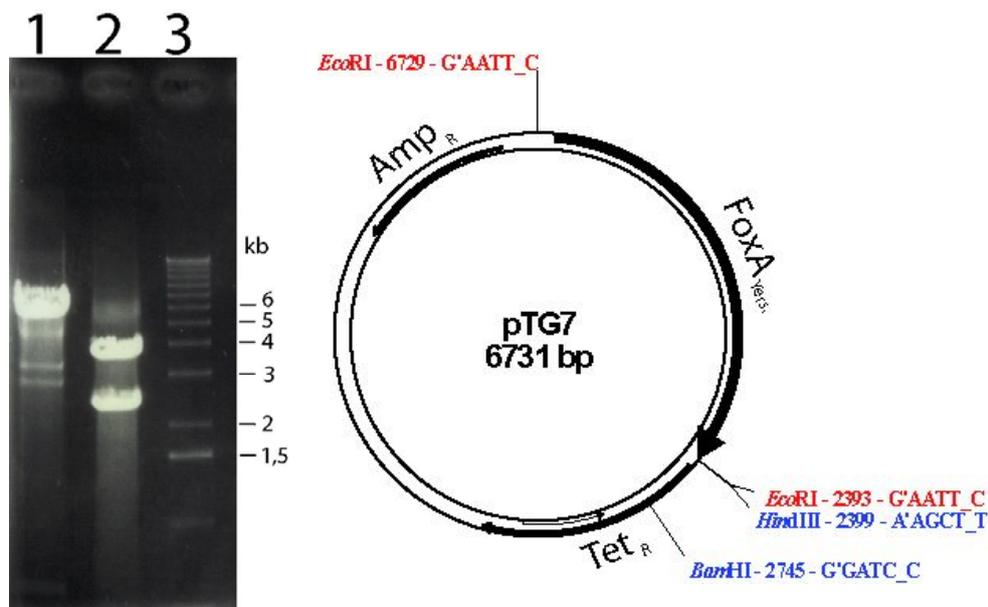
#### C.6.5. Salmycin wird intrazellulär inaktiviert

Um festzustellen, ob aufgenommenes Salmycin intrazellulär modifiziert wird, wurde *S. aureus* RN6390 nach 6 Stunden Anwachsen in 0,5 mg/ml Salmycin A inkubiert. Danach wurde der Cytoplasma-Anteil des Zellaufschlusses wie in B.2.4.8. beschrieben im Plattendiffusions-Assay mit *S. aureus* RN6390 auf Salmycinaktivität getestet. Es konnte kein Hemmhof beobachtet werden, woraus auf eine Inaktivierung von Salmycin durch Abbau geschlossen wurde.

## C.7. Aufnahme von Salmycin bei Gram-negativen Bakterien

### C.7.1. Klonierung von *foxA*<sub>Yers.</sub>

Die natürliche Resistenz von *E.coli* und anderer Gram-negativer Spezies war weiterer Bestandteil der Untersuchungen zu den Resistenzmechanismen gegen Salmycin. Es sollte untersucht werden, ob die fehlende Sensitivität von *E.coli* lediglich auf das Fehlen eines Rezeptors in der äusseren Membran zurückzuführen ist. Hierfür sollte der Ferrioxamintransporter eines Salmycin-sensitiven Gram-negativen Bakteriums in einen Vektor kloniert werden der sowohl bei *E. coli* als auch bei *Klebsiella pneumoniae* verwendet werden konnte. Die Entscheidung fiel auf *Yersinia enterocolitica*, da der Organismus während der Erfassung des Wirkspektrums eine deutliche Sensitivität zeigte und die Sequenz des äusseren Membrantransporters bereits veröffentlicht worden war (Bäumler & Hantke, 1992). Die Primer *Yent\_FoxA\_bamH1* und *Yent\_FoxA\_hind3* wurden anhand der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz von *Y.enterocolitica* 8081 entwickelt und das erhaltene Produkt (2,5 kB) in den Vektor pDrive zwischenkloniert. Positivklone wurden über XGal/Amp-Selektion isoliert. Der erhaltene Vektor erhielt die Bezeichnung pTG5.

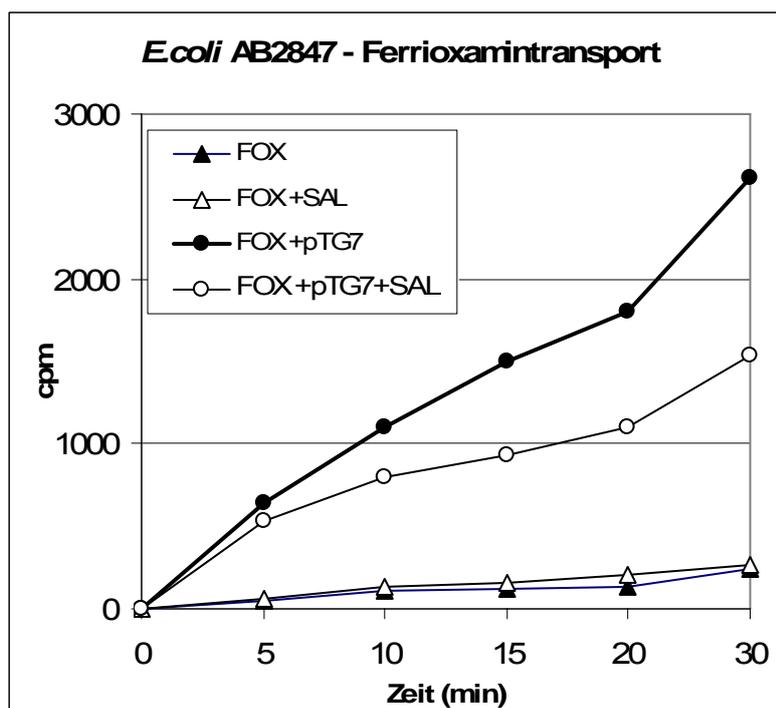


**Abb. C44** : (links) Klonierung des *FoxA*<sub>Yers.</sub>-Fragments. Isolierung von *FoxA* aus pTG5. (1) *Sma*I-Verdau (Kontrolle) von pTG5 führt zu Linearisierung, (2) Doppelverdau *Bam*HI/*Hind*III zeigt pDrive-Fragment (4 kB) und *FoxA*-Fragment (2,7 kB), (3) Marker. (rechts) Schematische Zeichnung des Vektors pTG7. Zur Herstellung wurde das *FoxA*<sub>Yers.</sub>-Fragment mit *Eco*RI/*Hind*III aus pTG5 geschnitten und in den low-copy Vektor pBR322 kloniert.

Aus ihm wurde die FoxA-Sequenz über die Schnittstellen EcoRI/HindIII isoliert und in den low-copy-Vektor pBR322 ligiert, so dass eine *tet*-Resistenz vorhanden war, gegen die in *K. pneumoniae* selektiert werden konnte. Der hergestellte Vektor wurde pTG7 bezeichnet (s. Abb. C44). Um genug Plasmid zu erhalten wurden zur Isolierung Midi-Präps verwendet. Die Isolierung des Plasmids pTG7 nach der Transformation in DH5 $\alpha$  verlief jedoch stets problematisch. Die präzipitierten Zellfragmente wiesen eine ungewohnt lockere Konsistenz auf und konnten nie vollständig sedimentiert werden. Die Ausbeute fiel daher sehr gering aus. Sowohl pTG5 als auch pTG7 wurden für Transportassays in *E. coli* verwendet. Für die Komplementation in *K. pneumoniae* wurde pTG7 verwendet.

### C.7.2. Komplementation von *E.coli* mit dem äusseren Membran-Transporter FoxA<sub>Yers.</sub>

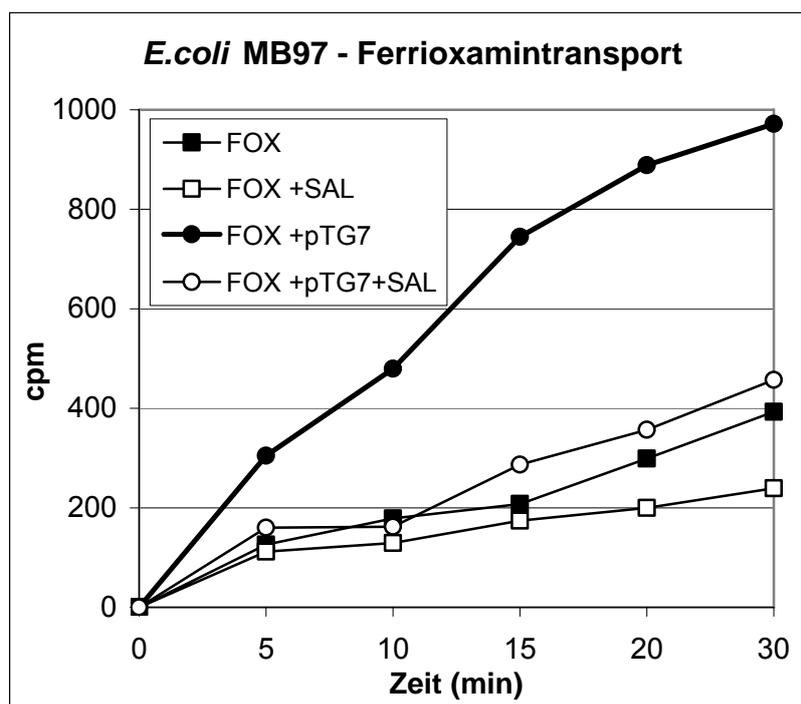
Um zu klären, ob die Resistenz der meisten Gram-negativen Bakterien gegen Salmycin auf Fehlen eines spezifischen Aufnahmesystems durch die äussere Membran beruht, wurden an verschiedenen *E. coli*-Mutanten Transportversuche und Komplementationsexperimente durchgeführt. Das bei *E.coli* für den Hydroxamattransport zuständige äussere Membranprotein FhuA erkennt Ferrichrom, nicht aber Ferrioxamin. Ferrioxamin wird in geringen Mengen über das Coprogen-Transportsystem FhuE aufgenommen.



Probe	Endpoint (cpm)
FOX	237
FOX +SAL	263
FOX +pTG7	2613
FOX+pTG7+SAL	1542

**Abb. C45 :**  
Transportverhalten von *E.coli* AB2847 (Transportassay mit <sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup>-Ferrioxamin).  
FOX = Ferrioxamin,  
SAL = Salmycin A;  
Probenvolumen 50  $\mu$ l,  
eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq;  
Konzentrationsverhältnis radioaktives <sup>55</sup>Ferrioxamin zu Salmycin 1:1,3.

*E. coli* ist jedoch natürlicherweise gegen Salmycin resistent. Ein erster Versuch war daher, einen Wildtyp-Stamm und eine FhuA-deletierte *E.coli*-Mutante mit einem Ferrioxamin-transportprotein zu komplementieren. Durch die Transformation von pTG7 in die Stämme DH4 $\alpha$ , AB2847 und MB97 konnte gezeigt werden, dass die äussere Membran bei Fehlen eines spezifischen Rezeptors eine für Salmycin unüberbrückbare Barriere bildet. Die Experimente zeigten, dass FoxA<sub>Yers.</sub> Salmycin als Substrat erkennt. Ferrioxamin wird sowohl in AB2847 (Abb. C45) als auch in MB97 (Abb. C46) nach Transformation mit pTG7 besser aufgenommen. Wird Salmycin als Konkurrenzsubstrat angeboten, sinken die Transportraten ab, was die Erkennung von Salmycin durch FoxA<sub>Yers.</sub> beweist. Im Bioassay mit Salmycin zeigten die Transformanden Hemmhöfe schwankender Grösse (9 – 20 mm), die oftmals milchig-trüb oder als Ringzone auftraten. Dies mag auf eine unterschiedliche Expressionsstärke des Transporters zurückführbar sei, kann aber auch auf den Einfluss degradierender Enzyme beruhen.



Probe	Endpunkt (cpm)
FOX	393
FOX + SAL	239
FOX + pTG7	972
FOX+pTG7+SAL	457

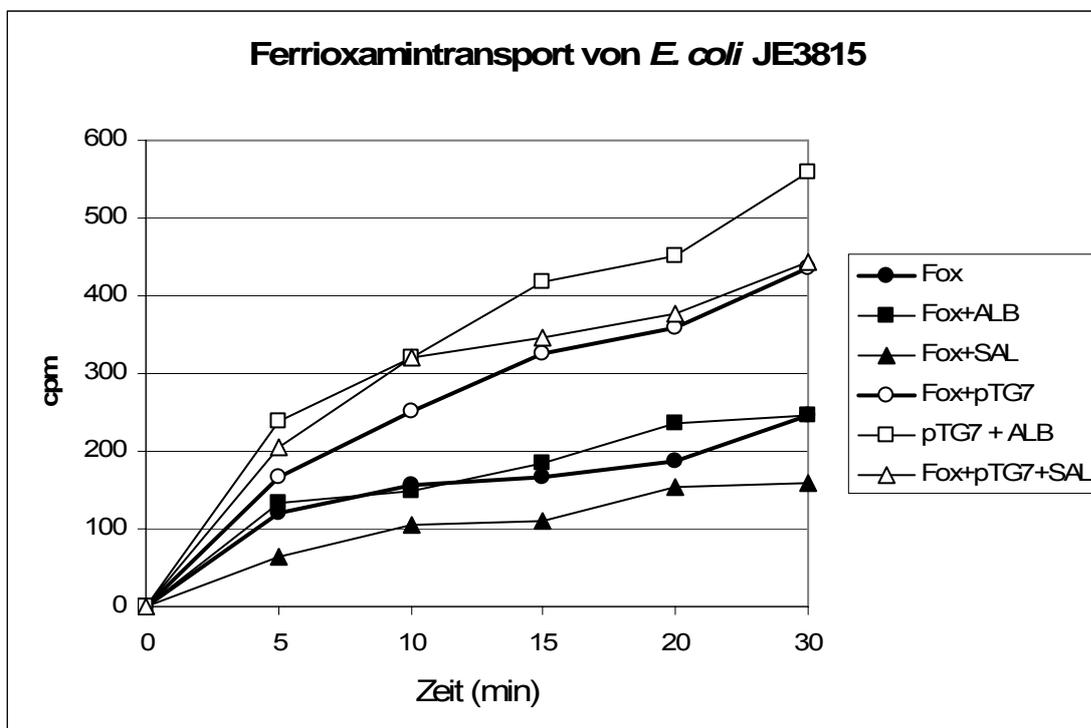
**Abb. C46 :**  
Transportverhalten von *E.coli* MB97 (Transportassay mit <sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup>-Ferrioxamin).  
FOX = Ferrioxamin,  
SAL = Salmycin A;  
Probenvolumen 50  $\mu$ l,  
eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq.  
Konzentrationsverhältnis radioaktiv markiertes Ferrichrom zu Salmycin 1:1,3.

### C.7.3. tatC ist notwendig für Salmycinaufnahme

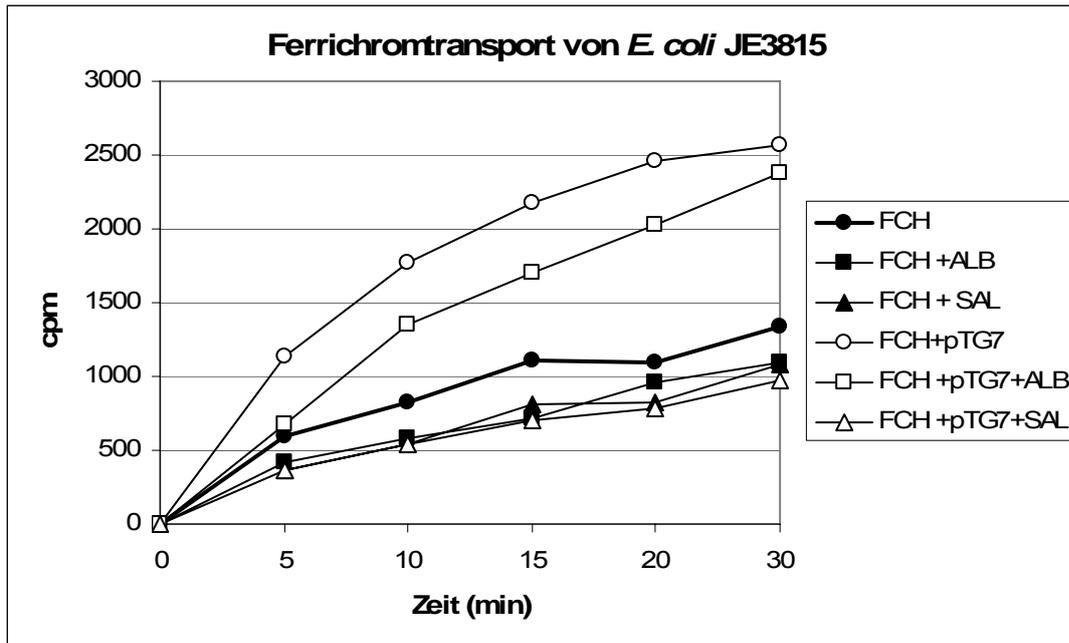
TatC ist ein cytosolisches Chaperon, welches die Prozessierung von FhuD<sub>E.coli</sub> maßgeblich beeinflusst (Ize et al., 2004; Sargent et al., 1999). Die Mutante  $\Delta$ tatC (Keiko-Stammsammlung, Japan) besitzt somit kein aktives FhuD im Periplasma. Da die Bindeproteine bei den untersuchten Gram-positiven Bakterien für das Fhu-System

eine Schlüsselfunktion in der Erkennung von Ferrichrom, Ferrioxamin und analogen Substraten einnehmen, sollte eine entsprechende Rolle von FhuD bei *E. coli* untersucht werden. Um zu prüfen, ob die Abwesenheit von FhuD die Salmycinaufnahme beeinflusst wurden mit JE3815 ( $\Delta$ tatC) Plattendiffusionstests und Radioassays durchgeführt.

Ohne FoxA<sub>Yers.</sub> (pTG7-Komplementation) zeigte die Mutante im Bioassay keine Sensitivität und die Transportraten für Ferrichrom und Ferrioxamin bewegten sich in Größenordnungen, die auf unspezifischen Transport deuten. Bei der FoxA-komplementierten Mutante stiegen die Transportraten auf etwa die doppelten Werte an, blieben damit aber noch immer weit unter den Normalwerten von *E. coli*, die um den Faktor 2 bis 10 höher liegen (vgl. Abb. C47, C48 und C46, C46). Auch sie blieben Salmycin-resistent. Aus den Versuchen wird geschlossen, dass die komplementierte  $\Delta$ tatC-Mutante Salmycin aufzunehmen vermag (ebenso Albomycin), aufgrund des fehlenden FhuD eine Einschleusung in das Cytoplasma jedoch unterbleibt. Die gemessenen Werte deuten eher auf eine Anreicherung der Sideromycine im Periplasma hin.



**Abb. C47** : Transportverhalten von *E. coli* JE3815 ( $\Delta$ tatC). Transportassay mit  $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -Ferrioxamin, Probenvolumen 50  $\mu\text{l}$ , eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq. FOX = Ferrioxamin, SAL = Salmycin A, ALB = Albomycin. n=3.

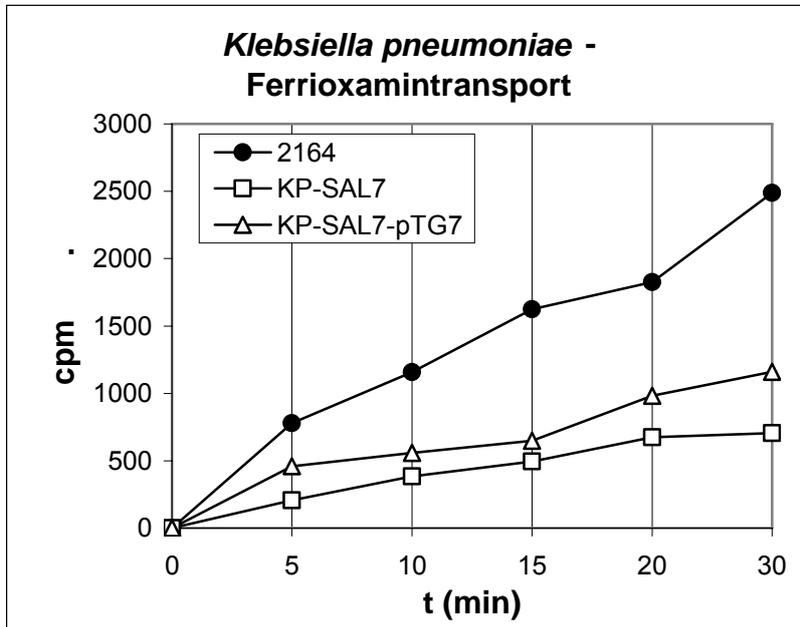


**Abb. C48 :** Transportverhalten von *E. coli* JE3815 ( $\Delta$ tatC; Transportassay mit  $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -Ferrichrom), Probenvolumen 50  $\mu\text{l}$ , eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq. FCH = Ferrichrom, SAL = Salmycin A, ALB = Albomycin, n=3.

#### C.7.4. Komplementation von *K. pneumoniae*

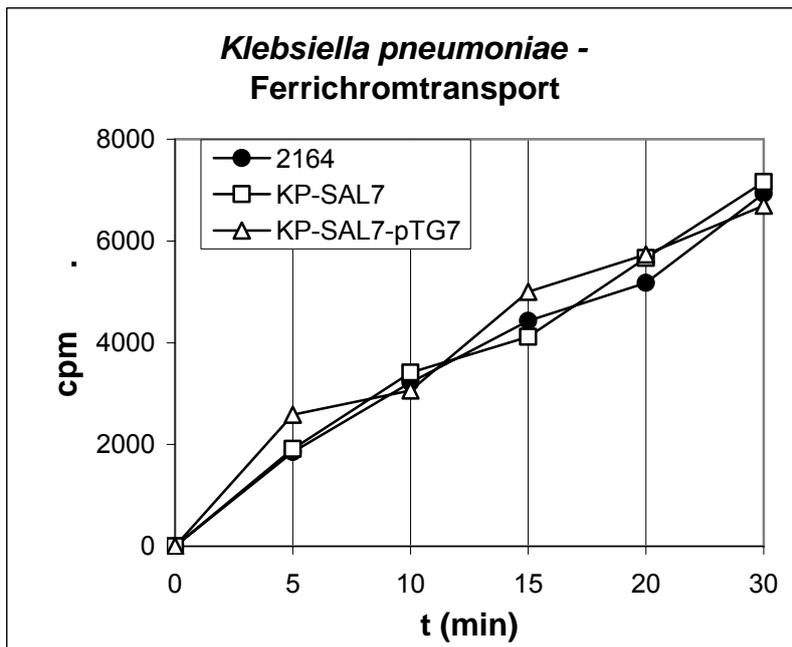
Wie bei *S. aureus* konnten auch aus den Hemmhöfen von *K. pneumoniae* 2164 Kolonien isoliert werden, die Resistenz gegen Salmycin zeigten, jedoch Albomycin-sensitiv blieben. Die Spontanmutante *K. pneumoniae* SAL7 zeigte auf Agarplatten Unempfindlichkeit gegen Salmycin und wies im Radioaktivtransport eine stark verminderte Aufnahme von Ferrioxamin auf. Durch die Transformation von FoxA<sub>Yers</sub> in KP-SAL7 wurde ihre Sensitivität im Plattendiffusions-Test wiederhergestellt. Aufnahmetests mit radioaktiven Substraten ergaben beim komplementierten KP-SAL7 gesteigerte Transportraten von bis 47% der Wildtyp-Transportraten (26% in der Relation Wildtyp – unkomplementierte Mutante; siehe Abb. C49). Die Transportraten für Ferrichrom blieben dagegen unbeeinflusst auf dem Niveau des Wild-Typs (Abb, C50). Dagegen war die Sensitivität im Bioassay weitaus deutlicher zu sehen als bei *E. coli* (Abb. C51). Da nur unzureichende Daten zur Transformation und Expression von Fremd-DNA in *K. pneumoniae* recherchiert werden konnten, fand die Durchführung der Versuche gemäss den bei *E. coli* standardisierten Protokollen statt. Die Transformationen von KP-SAL7 mit pTG7 und die anschliessenden Transporte verliefen daher sicherlich suboptimal. Dies zeigte sich insbesondere an Agglutination während der Aufreinigung des Plasmids und langsamen Wachstumsraten der Transformanden. Die nur mässig erhöhten Transportraten der komplementierten

Mutante können daher ein Resultat der mangelnden Expression von FoxA<sub>Yers.</sub> sein. Die Synthese des Proteins hatte eventuell toxische Folgen für den Zellstoffwechsel, was sich in einer Verminderung der Vitalität des Stammes zeigte.



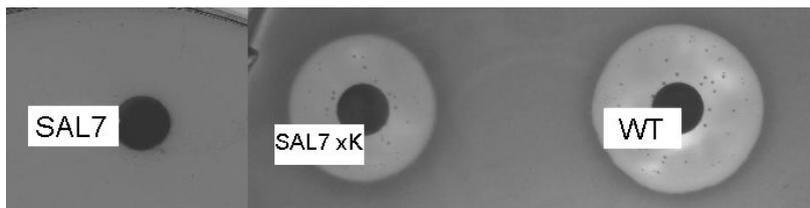
Probe	Endpoint (cpm)
2164	2489
SAL7	705
SAL7-pTG7	1161

**Abb. C49 :**  
Transportverhalten von *K. pneumoniae* 2164 (Transportassay mit <sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup>-Ferrioxamin), Probenvolumen 50 µl, eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq.



Probe	Endpoint (cpm)
2164	6931
SAL7	7162
SAL7-pTG7	6696

**Abb. C50 :**  
Transportverhalten von *K. pneumoniae* 2164 (Transportassay mit <sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup>-Ferrichrom), Probenvolumen 50 µl, eingesetzte Aktivität pro Sample: 13,6 kBq.

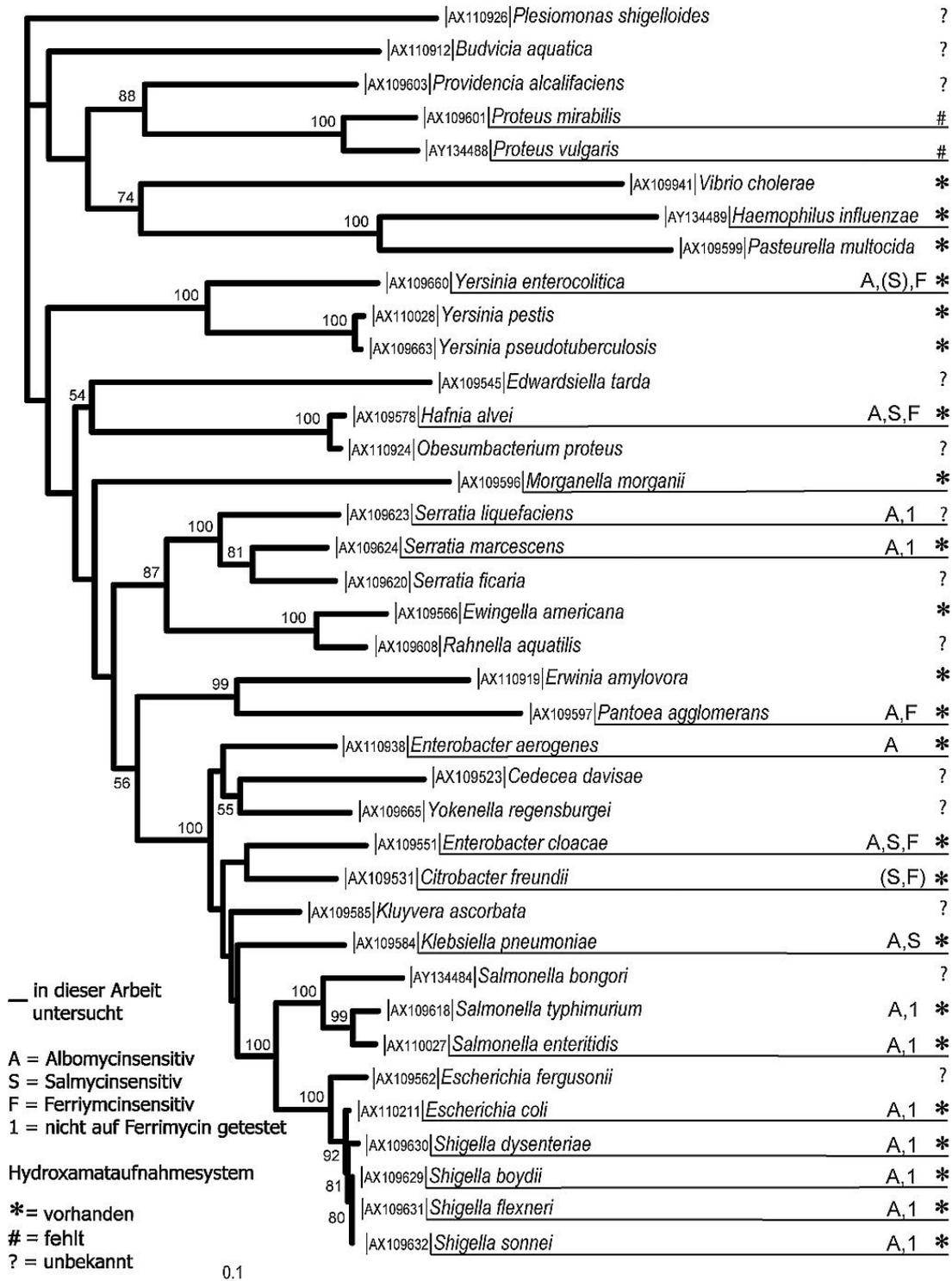


**Abb. 51 :** Bioassay von *K. pneumoniae*. von links: SAL7 unkomplementiert, Sal7 mit pTG7 komplementiert, und Wildtyp (2164); NBD-Medium, 10µg Salmycin A, Inkubation für 24 h bei 37°C.

## C.8. Salmycin-Sensitivität und Hydroxamataufnahme im phylogenetischen Zusammenhang

Nachdem das Wirkspektrum von Salmycin eingegrenzt war, erhob sich die Frage, ob sich die Sensitivität gegen das Antibiotikum in der Phylogenie widerspiegeln würde. Gruppieren sich salmycinsensitive Spezies im gleichen Cluster? Sind sie abhängig von der Fähigkeit zur Hydroxamataufnahme?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung bot sich aus zwei Gründen die Gruppe der *Enterobacteriaceae* an. Zum einen stellen die *Enterobacteriaceae* eine sehr gut eingegrenzte Gruppe dar. Analysen zur Phylogenie der Enterobakterien wurden bereits anhand unterschiedlicher Gensequenzen durchgeführt (Paradis et al., 2005; Dauga, 2002). Zum anderen wurden bei der Untersuchung des Wirkspektrums zahlreiche Enterobakterien erfasst. Nahezu alle untersuchten Salmycin-sensitiven Gram-negativen Spezies sind dieser Gruppe zugehörig. Die phylogenetischen Analysen dieser Arbeit lehnen sich an das Werk von Paradis et al. (2005) an. Als Grundlage diente die phylogenetische Untersuchung der Nukleinsäuresequenzen der F-ATPase  $\beta$ -Untereinheit einer Auswahl von Enterobakterien. Der erstellte Stammbaum wurde insofern modifiziert, als die Anzahl einbezogener Sequenzen reduziert wurde, ohne die momentan gültige Ordnung verfälscht wiederzugeben (siehe Abb. 52). Die Daten über das Vorhandensein eines Aufnahmesystems für Ferrichrom und Ferrioxamin wurden über Bioassays ermittelt, sofern die Spezies zur Verfügung stand. Für andere Stämme (\*) wurde in der Literatur oder in Sequenzdatenbanken recherchiert (Rabsch & Winkelmann, 1991; Reissbrodt et al. 1990). Die Neighbour Joining-Analyse ergab einen konsistenten Stammbaum der *Enterobacteriaceae*, der die zurzeit gängige Auffassung ihrer Einordnung wiedergibt. Der Abgleich der phylogenetischen Topologie mit den existierenden Daten über die Verbreitung von Hydroxamataufnahmesystemen zeigt die weite Verbreitung solcher Transportkomplexe innerhalb der *Enterobacteriaceae*. Salmycin-sensitive Spezies gruppieren in dieser Baumtopologie nicht zusammen, sondern treten verstreut im Stammbaum auf. Demgegenüber stehen albomycinsensitive Arten. Bis auf die entfernt stehende Aussengruppe um *Providencia* und *Proteus* tritt in allen Clustern eine Sensitivität gegen Albomycin auf. Die Sensitivität gegenüber den Sideromycinen geht stets mit dem Vorhandensein eines Hydroxamat-Transportkomplexes einher.



**Abb. C52 :** Stammbaum aus den Nucleinsäuresequenzen der F-ATPase  $\beta$ -Untereinheit ausgewählter Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* (modifiziert nach Paradis et al. [2005]; Neighbour Joining-Analyse über Dayhoff-Matrix, bootstrap-Werte aus 1000 Wdh. in %, root: *Plesiomonas shigelloides*; erstellt mit ClustalX/Treeview). Darauf eingetragen die Verbreitung des Hydroxamat-Transportsystems und Sensitivität gegen Salmycin, Albomycin und Ferrimycin. Getestet nach Standard-Verfahren im Bioassay wie zuvor beschrieben. Sofern nicht getestet beruhen die Daten auf Literaturrecherche (siehe Text C.8.).

## C.9. Untersuchung der Bindeproteine von *E.coli*, *S.aureus* und *B.subtilis*

### C.9.1. Sequenzvergleich der Bindeproteine

**Tab. C-XIII** : Homologie der unterschiedlichen Bindeproteine in Prozent. Errechnet aus Sequenzvergleichen mit 20 Alignments unter Verwendung der Blossom62-Matrix (Sequenzen aus EMBL/SWISSProt-Datenbank, Access No.: AAK92085.1, AAK92086.1, CAA63642.1, CAB15997.1, ohne Signalsequenzen).

	<b>FhuD1 (<i>S. aureus</i>)</b>	<b>FhuD2 (<i>S. aureus</i>)</b>	<b>FhuD (<i>B. subtilis</i>)</b>	<b>YxeB (<i>B. subtilis</i>)</b>
<b>FhuD1 (<i>S. aureus</i>)</b>	--			
<b>FhuD2 (<i>S. aureus</i>)</b>	41,9 % (in 301 AS)	--		
<b>FhuD (<i>B. subtilis</i>)</b>	38,8 % (in 268 AS)	37,6 % (in 303 AS)	--	
<b>YxeB (<i>B. subtilis</i>)</b>	30,0 % (in 300 AS)	34,8 % (in 287 AS)	39,8 % (in 307 AS)	--

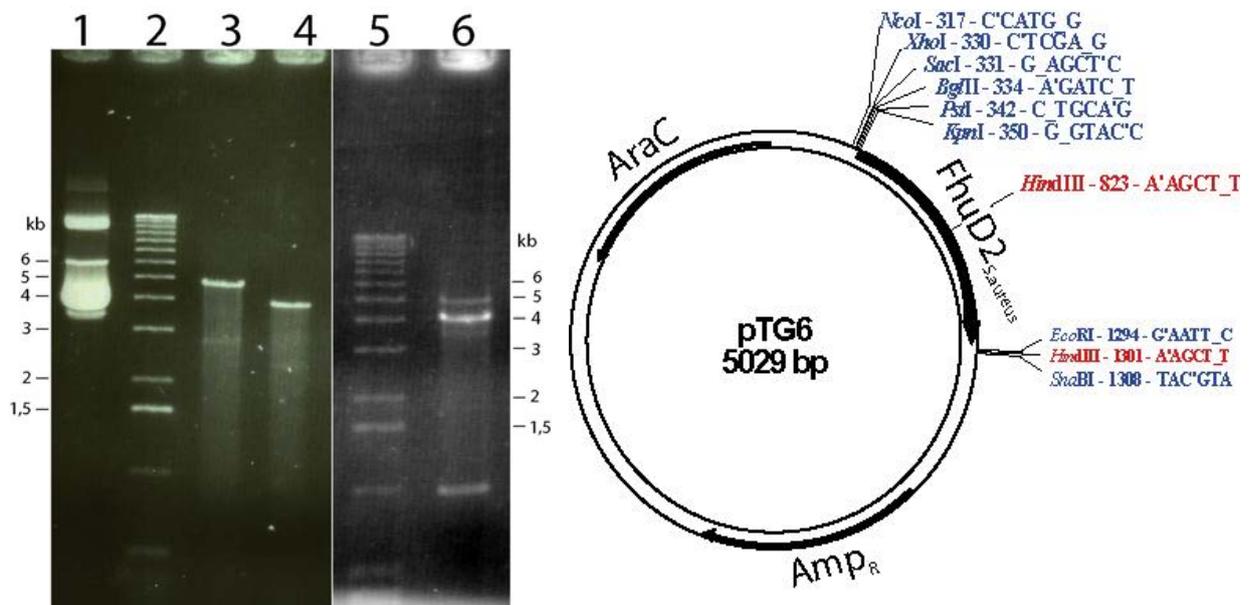
Aufgrund des identischen Aufbaus der beiden Fhu-Systeme von *B. subtilis* und *S. aureus*, sowie der homologen Eigenschaften ihrer beiden Bindeproteine hinsichtlich der Substraterkennung, ergab sich die Fragestellung, ob davon ausgegangen werden kann, dass sich beide Systeme einen gemeinsamen Vorfahren teilen. Hierzu wurden die vier Lipobindeproteine über BLASTp verglichen. Dieser Vergleich ergab überraschenderweise Sequenzübereinstimmungen im Bereich von lediglich 30 bis 42 %. Hierbei waren sich die Bindeproteine einer Art erwartungsgemäss ähnlicher als zwischen den Arten. Prozentual unterscheiden sich FhuD1 und YxeB am meisten. Allen vier verglichenen Proteinen sind lediglich vier identische Sequenzmotive gemeinsam: PKR (Pos. 59), PDLII/VV (Pos. 117), KIVAPT (Pos. 135) und GRGG/L (Pos.214). Dem YxeB-Protein fehlt das in den anderen Proteinsequenzen vorkommende Motiv AGDYI (Pos. 255). Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass entweder FhuD (*B. subtilis*) oder FhuD2 (*S. aureus*) der Urahn dieser Hydroxamatbindeproteine ist. Eine Genduplikation innerhalb einer Art, wie von Sebelsky et al. (2001) postuliert, ist wahrscheinlich.

### C.9.2. Klonierung von FhuD2<sub>S.aureus</sub>

Nachdem die Relevanz von FhuD2 von *S. aureus* bei der Aufnahme von Salmycin deutlich geworden war, sollte das Bindeverhalten des Proteins untersucht werden.

Hierfür wurde FhuD2 in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und anschliessend Western Blots und Proteaseschutzexperimente durchgeführt.

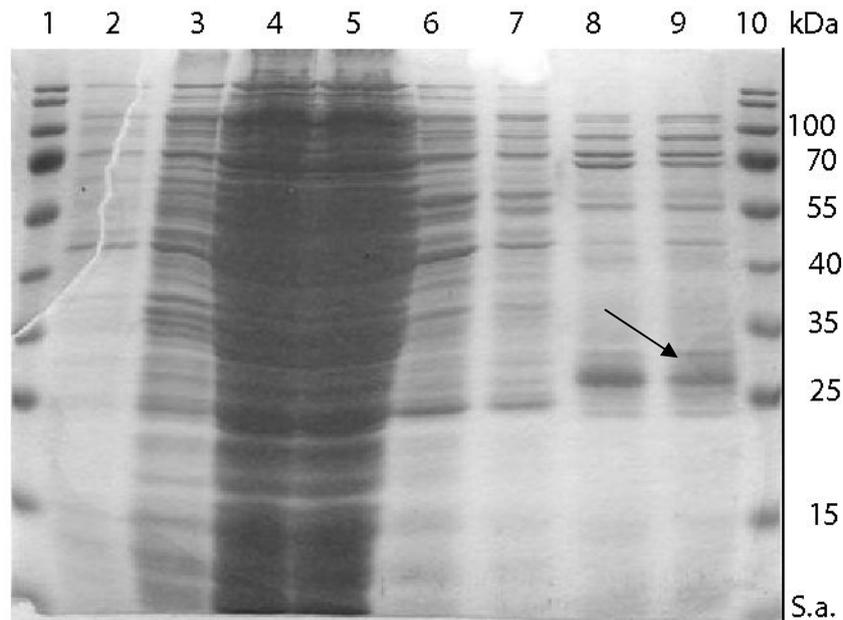
Die verwendeten Primer FhuD2\_kpn1\_F und FhuD2\_EcoRI\_R wurden anhand der Datenbanksequenz von *S. aureus* MW2 mit dem Programm Netprimer entwickelt und optimiert. Zur Amplifikation wurde genomische DNA von *S.aureus* RN6390 verwendet. Das resultierende PCR-Fragment (923 bp) wurde aufgereinigt in den Vektor pBAD Myc/HisC kloniert. Der entstandene Klon wurde pTG6 bezeichnet (vgl. Abb. C53). Durch die Verwendung der MCS des Plasmids wurde ein C-terminaler 6xHis-Tag angefügt, der die spätere Aufreinigung über Ni-NTA-Verfahren ermöglichte.



**Abb. C53** : Klonierung von FhuD2 in pBAD Myc/His-C. (1) Kontrollverdau pBAD nach Plasmidisolierung (4 kb), (2) Marker, (3) Positivklon (5 kb), (4) Negativklon, alle Fragmente SacI-verdaut. (5) Marker, (6) Kontrollverdau mit EcoRI/KpnI des Positivklons (pTG6) führt zu zwei Fragmenten – FhuD2<sub>S.aureus</sub> (923 bp) und pBAD Myc/His-C (4,1 kb); rechts: Schematische Zeichnung des Vektors pTG6.

### C.9.3. Überexpression von pTG6

Die Expression erfolgte im Stamm *E.coli* BL21 DE3. Nach Elektroporation wurde der Stamm in 3 ml Vorkultur angezogen. Zur Überexpression wurde ein Volumen von 250 ml TY/Amp-Medium verwendet. Vorab unternommene Tests zeigten eine Induktion der Proteinexpression ab einer Zugabe von 0,02 % Arabinose zum Gesamtvolumen. Zellernte und -aufschluss erfolgten wie im Methodenteil vermerkt, ebenso die His-tag-FhuD2-Aufreinigung. Ein SDS-PAGE diente zur Kontrolle des Expressionserfolges (siehe Abb. C54).

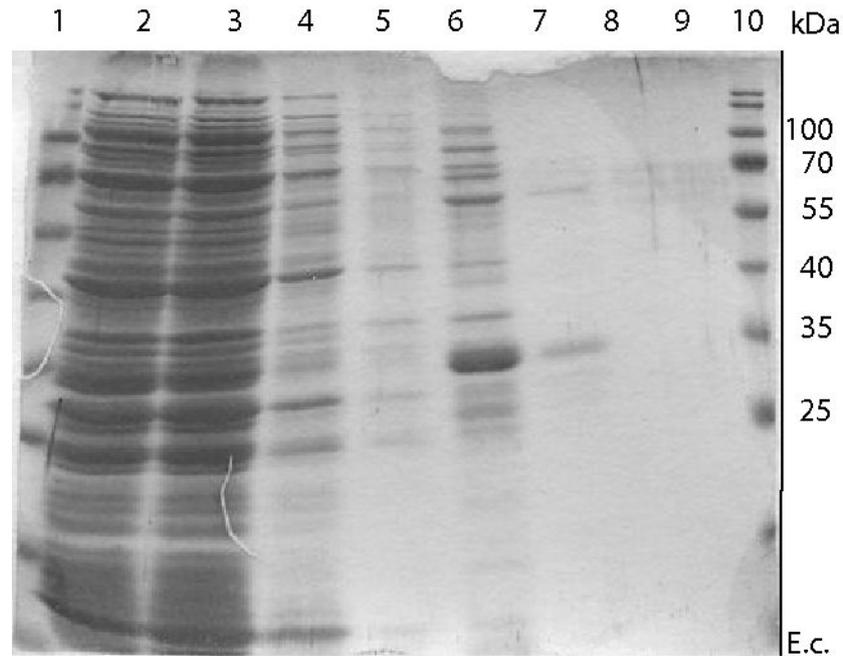


**Abb. C54** : SDS-PAGE der Überexpression von FhuD2 *S. aureus* über das Plasmid pTG6. (1) Marker, (2) Zellysate vor Induktion, (3) Zellysate nach Induktion, (4) Zellaufschluss, (5) bis (7) Waschschrte, (8) und (9) Elutionschritte, (10) Marker (PageRuler, Fermentas)

Die SDS-PAGE zeigt sämtliche Stufen der Proteinaufreinigung vom Zeitpunkt vor der Induktion bis zu den Elutionsschritten in denen das His-Tag-Protein ausgewaschen wird. Die Spuren 8 und 9 zeigen deutlich die FhuD2-Banden im Bereich zwischen 25 und 35 kDa, wobei die korrekte Fragmentgrösse 34 kDa betragen sollte. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den stärkeren Banden um Abbaubanden von FhuD2<sub>S.aureus</sub> handelt. Die eigentliche FhuD2<sub>S.aureus</sub>-Bande ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

#### C.9.4. Überexpression von pMR20 (Rohrbach, 1995)

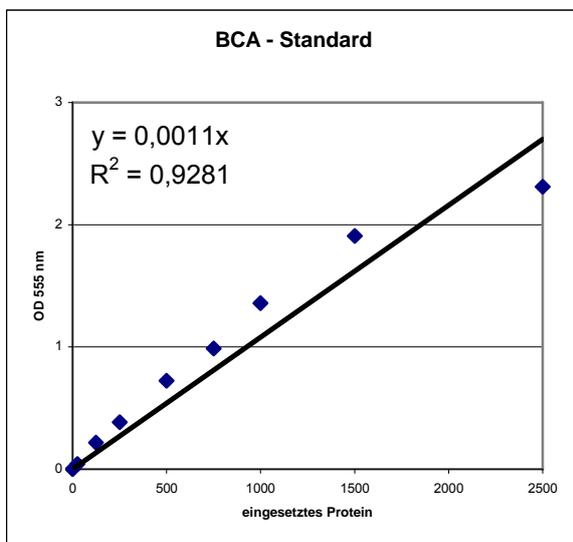
Der Expressionsvektor pMR20 wurde aus der Stammsammlung entnommen und zum Vergleich ebenfalls überexprimiert. Er enthält die Sequenz des *E.coli* -FhuD (NotI/EcoRI-ligiert, ohne Signalsequenz) auf einem pET19b (His-tag)-Vektor mit modifizierten Polylinker, und ist durch IPTG induzierbar. Die Überexpression erfolgte daher nach einem anderen Schema als bei pTG6 (siehe B.2.7.1, Tab B-VIII). Als Induktor für pMR20 diente IPTG (0,1 M). Der Expressionserfolg wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abb. C55). Das Gel zeigt in Spur 6 und 7 deutliche Banden im Bereich von 31 kDa, der korrekten Grösse des überexprimierten Fragments. Die Aufreinigung über His-Tag erfolgte gemäss Protokoll ohne Probleme.



**Abb. C55** : SDS-PAGE der Überexpression von *E.coli* FhuD über das Plasmid pMR20. (1) Marker, (2) Zellaufschluss, (3) bis (5) Waschschrte, (6) und (7) Elutionsschritte, (8) Zellüberstand nach Zentrifugation, (9) leer, (10) Marker (PagerRuler, Fermentas)

### C.9.5. Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay

Um die Menge des überexprimierten Proteins zu bestimmen wurde ein BSA-Standard hergestellt und mit dem eluierten Protein (1. und 2. Elutionsschritt) des Zellaufschlusses verglichen. Die Überexpression von FhuD<sub>E.coli</sub> ergab eine Ausbeute von 764 mg/l, die von FhuD2<sub>S.aureus</sub> 591 mg/l (vgl. Abb. C56). Die Expression war in beiden Fällen somit erfolgreich, auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch unklar war, ob funktionelle Proteine gewonnen werden konnten.

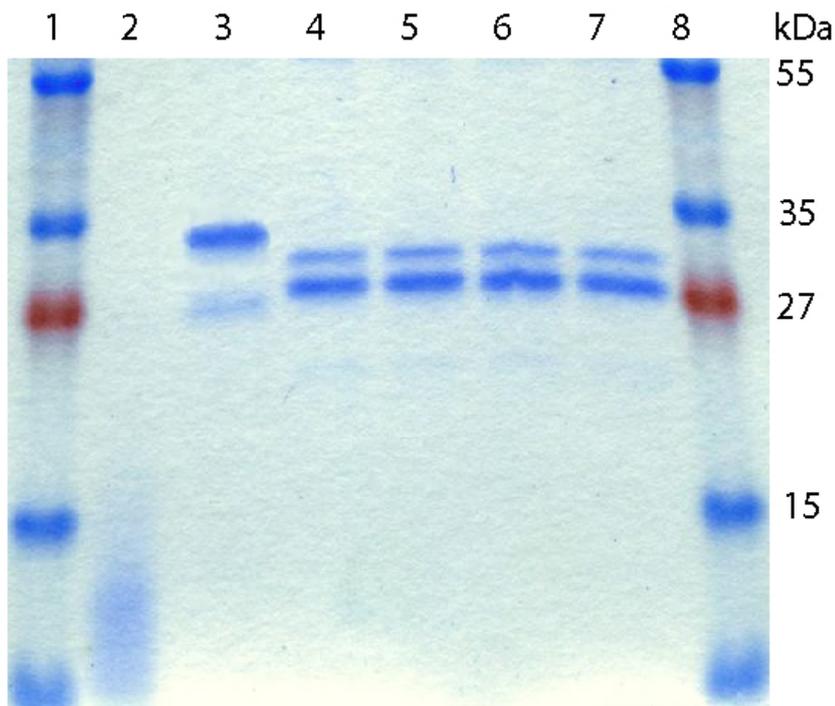


	OD <sub>555nm</sub>	mg/l
<b><i>E. coli</i> - FhuD</b>		
Elution 1	0,841	764,09
Elution 2	0,342	310,45
<b><i>S. aureus</i> - FhuD2</b>		
Elution 1	0,651	591,36
Elution 2	0,409	371,82

**Abb. C56** : Eichstandard für Proteinbestimmung mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß.  
Tabelle oben: gemessene Werte und Umrechnung in Proteinkonzentration.

### C.9.6. Bindungsassays mit den aufgereinigten Proteinen

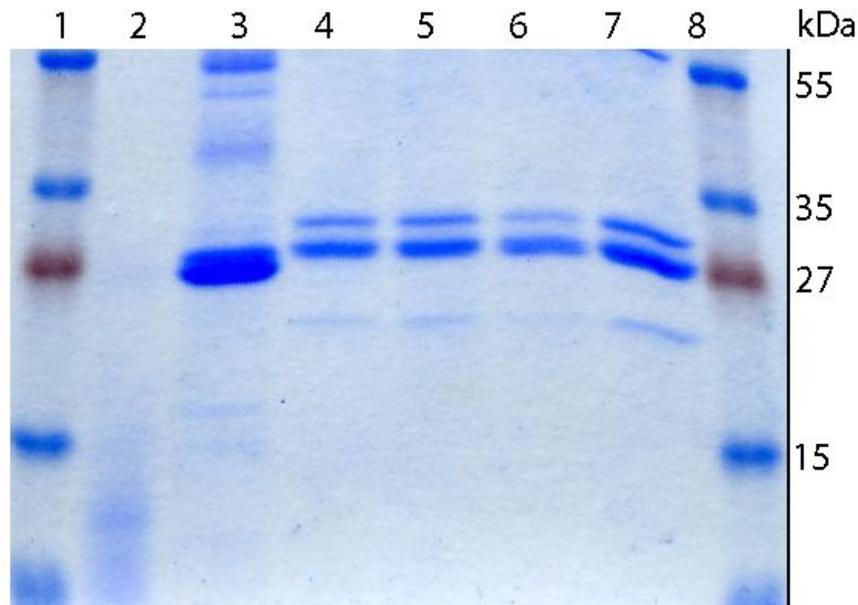
Um die Ergebnisse des Transportassays zu bestätigen, wurden Bindeassays mit dem überexprimierten Protein FhuD2<sub>S.aureus</sub> durchgeführt, um zu zeigen dass FhuD2<sub>S.aureus</sub> Salmycin A als Substrat erkennt. Dies geschah über eine Proteinase K-Verdau, der mittels einer SDS-PAGE dargestellt wurde (Abb. 57).



**Abb. 57** : SDS-PAGE von FhuD<sub>E.coli</sub> nach Proteinase K-Verdau, 30 min, 55°C.  
1 + 8 Marker (PagerRulerPlus, Fermentas), 2 verdaut ohne Substrat, 3 unverdaut, 4 Ferrichrom, 5 Albomycin, 6 Ferrioxamin, 7 Salmycin A.

Das frisch isolierte FhuD<sub>E.coli</sub> läuft bei etwa 33 kDa. Nach Inkubation mit verschiedenen Substraten treten drei Banden in den Bereichen 30, 27 und 24 – 25 kDa (schwach) auf, im Vergleich zu keiner Bande bei Verdau ohne Substrat. Aufgrund der Bindung von Siderophoren wird der Core-Bereich von FhuD<sub>E.coli</sub> vor dem Verdau geschützt.

Das SDS-PAGE mit dem Verdau von FhuD2<sub>S.aureus</sub> zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 58). Interessant ist, dass die unverdaute Probe als massive Bande bei etwa 27 kDa (Spalte 3) läuft und damit kleiner als die von der Literatur angegebenen 36 kDa (Sebulsky et al. 2001). Die Signalsequenz von FhuD umfasst 28 Aminosäuren (3-4 kDa). Damit sollte auch die prozessierte Form des Proteins eine Grösse von mehr als 30 kDa besitzen.



**Abb. C58 :** SDS-PAGE von FhuD2<sub>S.aureus</sub> nach Proteinase K-Verdau. 1 + 8 Marker (PagerRulerPlus, Fermentas), 2 verdaut, 3 unverdaut, 4 Ferrichrom, 5 Albomycin, 6 Ferrioxamin, 7 Salmycin A.

Möglich ist, dass das Protein nicht vollständig entfaltet wurde und als Knäuel das Gel schneller durchlief als die verdauten Proben. Die Verdaubanden mit zugegebenen Substraten sind identisch und zeigen eine ähnliche Bandenverteilung wie der Verdau von FhuD<sub>E.coli</sub>. Anhand der Ergebnisse wäre somit eine Affinität von FhuD2<sub>S.aureus</sub> nachgewiesen.

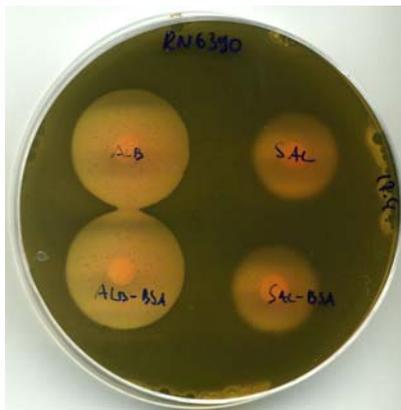
## C.10. Zytotoxizität

Bevor die Wirksamkeit von Salmycin gegen Infektion im Maus-Modell getestet werden sollte, wurden Zytotoxizitäts-Assays an HEp2-Zellen durchgeführt. Durch diese Tests konnten Daten über den Einfluss von Salmycin auf die Vitalität eukaryotischer Zellen gesammelt und erste Risiken hinsichtlich Toxizität der Substanz abgeschätzt werden.

### C.10.1. Einfluss von BSA auf die Bioaktivität

Im Vorversuch zur Zytotoxizitätsbestimmung von Salmycin musste ausgeschlossen werden, dass eine Minderung der Bioaktivität durch Bindung an Serumproteine auftritt. Da Albumine einen Anteil von 20 % und mehr im humanen Serum einnehmen (Dörner, 2006), wurde BSA als Testagens eingesetzt. Dieser klärende Schritt war auch für die später angesetzten *in-vivo*-Studien notwendig. Der Plattendiffusions-Test wurde hierfür in modifizierter Form auf NBD und Vogel-Johnson-Medium durchgeführt und der

entstehende Hemmhof mit dem der Kontrollgruppe ohne BSA verglichen. Die Grösse der Hemmzonen mit BSA-Zusatz war in drei von vier Ansätzen identisch. Die vierte Testplatte zeigte eine um  $\pm 0,5$  mm grössere Hemmzone bei BSA-Zusatz, der jedoch nicht als signifikant gewertet wurde (siehe Abb. C59). Auf denselben Platten wurde mit Albomycin auf identische Weise verfahren. Auch hier wiesen die Hemmzonen keine markanten Abweichungen auf.



Salmycin	Ansatz	Ø (mm)	Ø (mm)	
			+ BSA	+ BSA
RN6390	1	16,5	16,5	17,5
	2	16,5	16,5	17,0
VA24500	3	19,0	19,0	19,5
	4	19,0	19,0	20,0

Albomycin	Ansatz	Ø (mm)	Ø (mm)	
			+ BSA	+ BSA
RN6390	1	22,0	22,0	22,5
	2	22,0	22,0	23,0
VA24500	3	27,0	27,0	28,0
	4	27,0	27,0	28,0

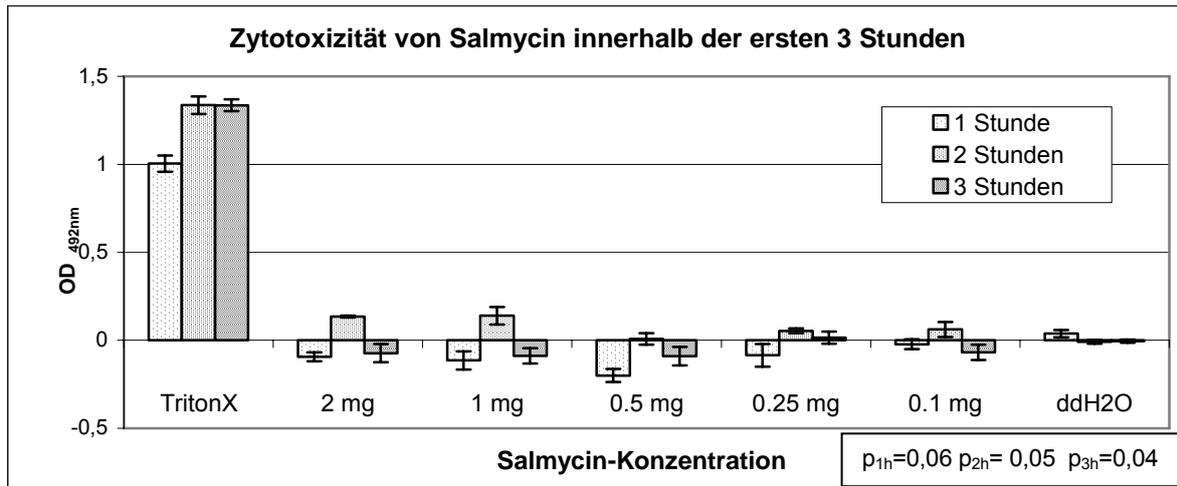
**Abb. C59** : Plattendiffusionstest auf VJ-Agar. Albomycin (links) und Salmycin (rechts), je 10 µg. Den unteren beiden Salmycin-Lösungen wurde BSA (5% Endkonzentration) zugefügt und nach 16 h Inkubation der Hemmhof gemessen. (n=2x 2 Ansätze auf VJ und NBD-Medium).

Die auftretenden Unterschiede waren stets auf dem eisenarmen NBD-Medium zu beobachten, das generell grössere und schärfer differenzierte Hemmzonen begünstigt. Im *in-vitro*-Versuch konnte somit kein negativer Einfluss von Serumproteinen auf die Bioaktivität von Salmycin und Albomycin nachgewiesen werden.

### C.10.2. Konzentrationsabhängige Zytotoxizität

Die Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Salmycinkonzentration wurde drei, acht und 16 h nach Zugabe gemessen (s. Abb. 60). Toxische Effekte im LDH-Assay sind bereits innerhalb der ersten Stunden nachweisbar. Um eine langfristig einsetzende zytotoxische Wirkung zu erfassen, wurden im grösseren zeitlichen Abstand zwei weitere Ansätze gemessen. Zudem wurden sehr hohe Salmycin-Konzentrationen (0,1 – 2,0 mg/ml) eingesetzt, die in tierischem Gewebe vermutlich nicht erreicht werden.

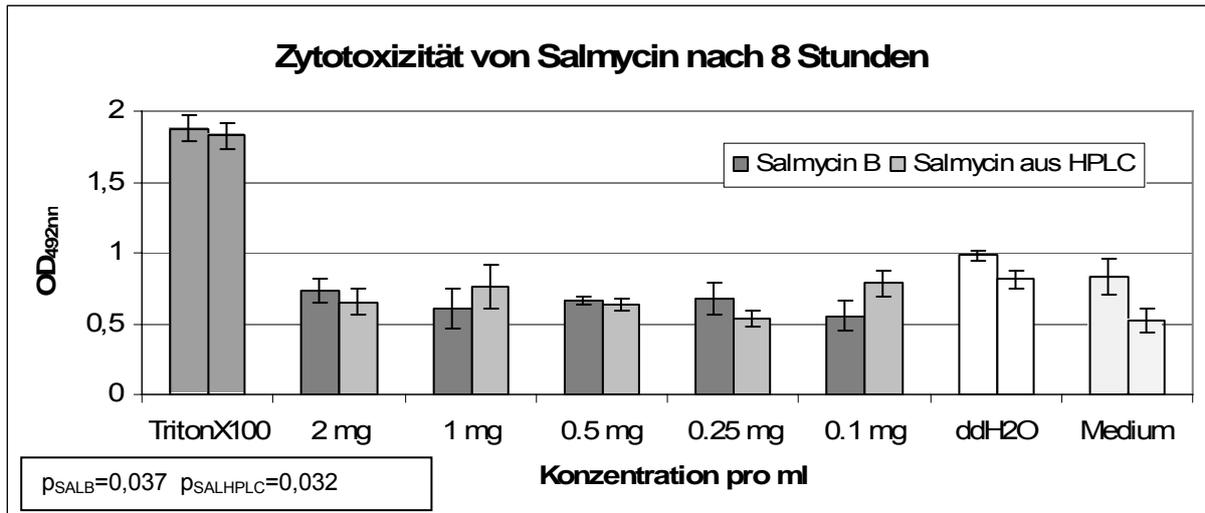
In den ersten drei Stunden nach Zugabe von Salmycin B zeigte sich keine eindeutige Zytotoxizität (s. Abb. C60). Die Werte nach zweistündiger Inkubation lagen stets leicht über dem Nullwert, mit diskret fallender Tendenz bei niedrigeren Konzentrationen. Im



**Abb. C60** : Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Salmycin B im LDH-Assay nach 1, 2 und 3 Stunden (Nullwert abgezogen);  $5 \times 10^4$  Zellen/ml, 200  $\mu$ l Volumen; Inkubation bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, danach 30 min Inkubationszeit bei RT nach Zugabe des Enzym-Mix zu 100  $\mu$ l Zellüberstand; dreifach bestimmt, gemittelt.

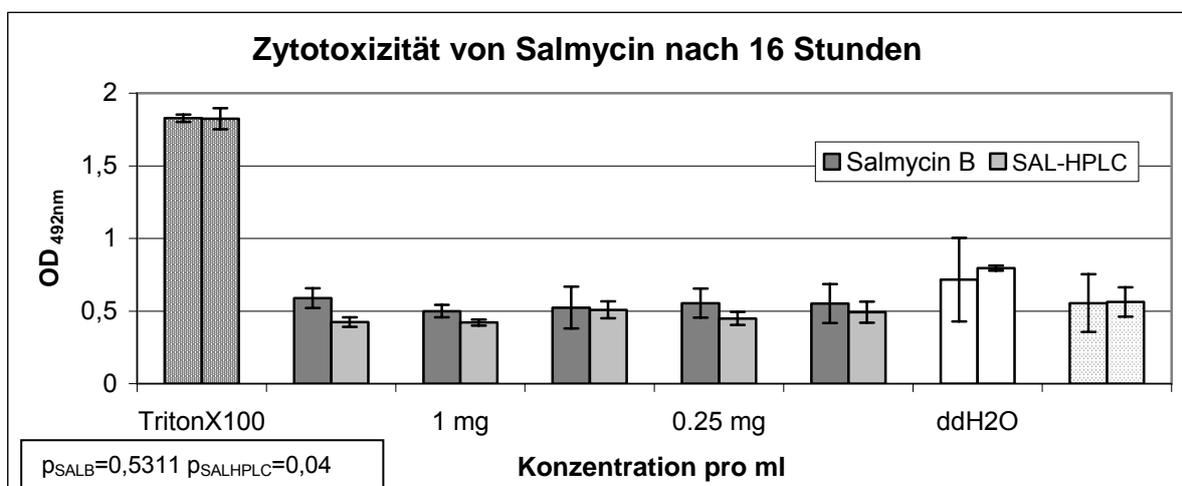
Gegensatz dazu zeigten die Ein- und Dreistundenwerte, ein fortwährendes Unterschreiten des Nullwertes. Eine zytotoxische Eigenschaft innerhalb der ersten drei Stunden war somit nicht nachweisbar. Die mittlere Standardabweichung für Werte nach einstündiger Inkubation lag nach Abzug des Nullwertes bei 0,044, nach zwei Stunden bei 0,019 und nach drei Stunden bei 0,015. Im verbundenen t-Test (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ,  $p \leq 0,05$ ;  $H_0 =$  Salmycin wirkt nicht cytotoxisch) werden die Werte der ersten zwei Stunden als nicht signifikant bewertet. Das bedeutet, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Salmycin keinen toxischen Einfluss auf die Zellen ausübt. Der p-Wert aus der Analyse der Drei-Stunden-Werte ( $p_{3h} < 0,05$ ) ist hingegen als signifikant zu werten und weist darauf hin, dass ein Einfluss von Salmycin auf die Zellen zu erwarten ist. Da die Werte in dieser Gruppe mehrheitlich niedriger liegen als die Kontrollwerte ist dieses Ergebnis jedoch zu verwerfen. Der LDH-Assay lässt keine Rückschlüsse auf positive Einflüsse von Testsubstanzen zu.

Werden die Hep2-Zellen acht Stunden mit unterschiedlichen Salmycinkonzentrationen inkubiert, so zeigt der LDH-Assay eine deutliche Reaktion auf freigesetztes Lactat in den Salmycinproben. Die Auswertung im t-Test ergibt für die erhaltenen Messergebnisse signifikante p-Werte. Beide Substanzen unterscheiden sich in ihren Grundgesamtheiten deutlich von der Kontrollgruppe, so dass von einem Einfluss von



**Abb. C61** : Konzentrationsabhängige Zytotoxizität im LDH-Assay ,  $5 \times 10^4$  Zellen/ml, 200  $\mu$ l Volumen, 8 h bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 30 min Inkubationszeit (RT) nach Zugabe des Enzym-Mix zu 100  $\mu$ l Zellüberstand, dreifach bestimmt, gemittelt.

Salmycin ausgegangen werden muss (Abb. C61). Salmycin B unterschreitet die Werte der Negativkontrolle im Schnitt um -0,130 ( $p_{SALB}=0,032$ ). Wie bei den Drei-Stunden-Werten hat der Test dadurch keine Aussagekraft. Beim eigenpräparierten Salmycin wurde dagegen eine Überschreitung von durchschnittlich 0,165 ermittelt. Der zugehörige p-Wert ( $p_{SALHPLC}=0,037$ ) führt zu der Testentscheidung, dass eine cytotoxische Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegt. Die geringe Standardabweichung spiegelt die Konstanz der gemessenen Werte wieder. Die Werte zeigen, dass der durch destilliertes Wassers verursachte osmotische Stress, den Zelltod stärker induziert als Salmycin.

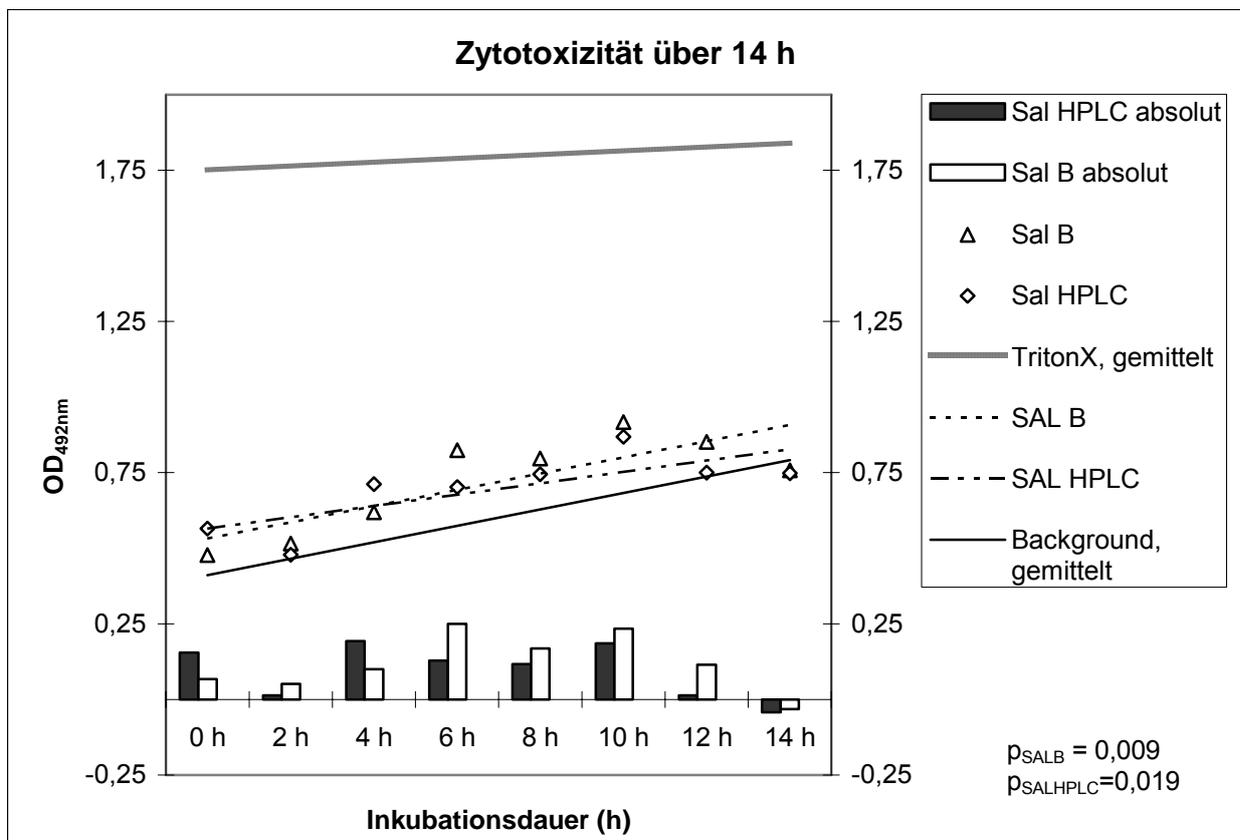


**Abb. C62** : Konzentrationsabhängige Zytotoxizität im LDH-Assay ,  $5 \times 10^4$  Zellen/ml, 200  $\mu$ l Volumen, 16h bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 30 min Inkubationszeit (RT) nach Zugabe des Enzym-Mix zu 100  $\mu$ l Zellüberstand; dreifach bestimmt, gemittelt.

Ebenso stellte sich die Situation nach 16 Stunden Inkubation dar (Abb. C62). Für HPLC-präpariertes Salmycin ist ein cytotoxischer Effekt wahrscheinlich ( $p_{\text{SALHPLC}}=0,04$ ), wohingegen Salmycin B von Hoechst keinen signifikanten Wert lieferte ( $p_{\text{SALB}}=0,53$ ). Die Abweichung von der Negativkontrolle beträgt im Mittel 0,018 (Salmycin B) bzw. 0,047 (HPLC-Salmycin) bei geringer Streuung der Einzelwerte.

### C.10.3. Zeitkinetik

Für die Zeitkinetik wurde eine Salmycin-Konzentration von 125 µg/ml gewählt. Es wurden 14 Stunden lang alle zwei Stunden Proben entnommen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Inkubationszeit von 30 min nach Zugabe des Enzym-Mixes exakt eingehalten wurde. Unterschiedliche Messzeitpunkte führten aufgrund des colorimetrischen Verfahrens zu höheren Messfehlern bei der OD<sub>492</sub>-Bestimmung im Bereich von 0,02 bis 0,05 pro 5 Minuten. Das kombinierte Linien-Balken-Diagramm (Abb. C63) zeigt die gemessenen OD<sub>492</sub>-Werte im Zeitverlauf nach Abzug des Nullwertes.



**Abb. C63** : Konzentrationsabhängige Zytotoxizität im LDH-Assay , 5x 10<sup>4</sup> Zellen/ml, 200 µl Volumen, 16h bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 30 min Inkubationszeit (RT) nach Zugabe des Enzym-Mix zu 100 µl Zellüberstand; dreifach bestimmt, gemittelt. Absolutewerte beziehen sich auf Messwerte mit abgebogenem Nullwert.

Die Standardabweichung bewertet die Streuung der Werte für Salmycin B mit 0,06 (minimal 0,025, maximal 0,085; Ausreisserwert bei 10 h: 0,129), für HPLC-Salmycin mit 0,03 (minimal 0,015, maximal 0,048). Im darüber gelegten Liniendiagramm sind die Messpunkte als Symbole sowie als gestrichelte Trendlinie eingetragen. Positivkontrolle (Triton X-100) und Nullwert sind als durchgezogene Linien verzeichnet.

Die Tendenz dieses Versuchs zeigt, dass die Zugabe von Salmycin zu einem leicht erhöhten Zelltod führt. Der Effekt ist insbesondere im Zeitraum zwischen vier und zehn Stunden nach Applikation erkennbar. Die Abweichung der Linie von Salmycin B liegt im Mittel bei +0,119, für HPLC-Salmycin bei +0,095. Die Abweichung des Mittelwerts der Positivkontrolle beträgt mit +1,193 rund das Zehnfache dieser ermittelten Werte.

Beim colorimetrischen LDH-Assay besteht ein direkter proportionaler Bezug von freigesetztem Lactat zur OD-Änderung. Dadurch lässt sich aus den Ergebnissen der Zeitkinetik schliessen, dass die Zugabe von Salmycin zu einer Erhöhung der Zellsterberate von 9 - 10% gegenüber dem Normalwert führt. Diese Daten werden im t-Test durch signifikante p-Werte ( $p_{\text{SALB}} = 0,009465$ ;  $p_{\text{SALHPLC}} = 0,01893$ ) unterstützt.

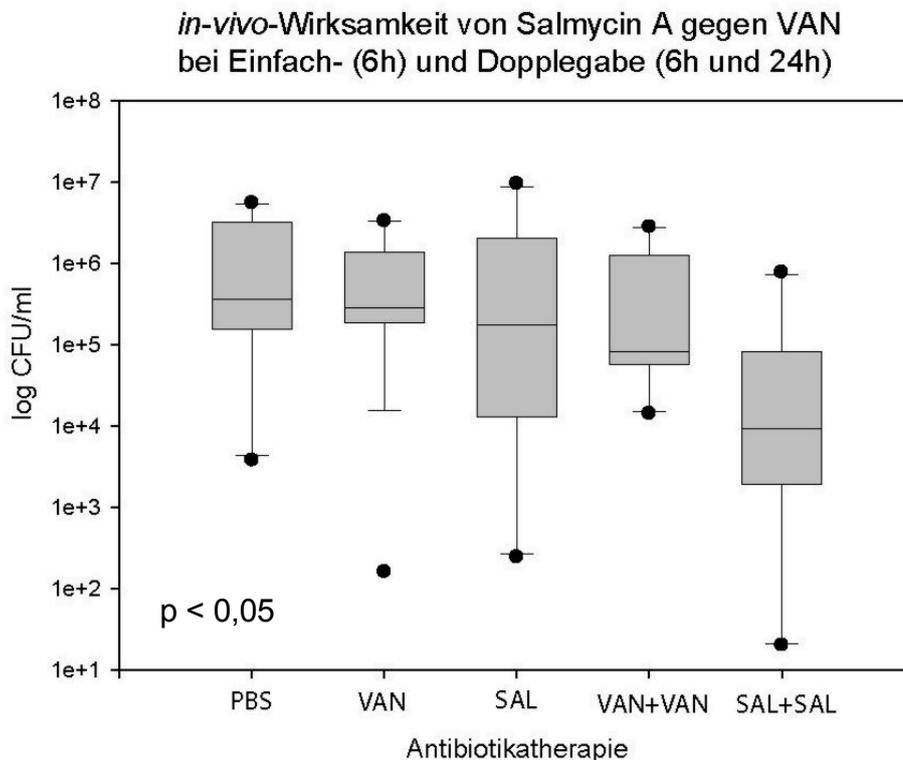
### **C.11. *in-vivo*-Wirksamkeit von Salmycin gegen Methicillin-resistente *S. aureus***

Nachdem das Wirkspektrum eingegrenzt und eine gravierende Zytotoxizität durch den LDH-Assay ausgeschlossen werden konnte, wurde die *in-vivo*-Wirksamkeit von Salmycin im Mausmodell bestimmt. Hierzu wurden CD1-Mäuse mit  $1 \times 10^8$  CFU des Methicillin-resistenten Stamm *S. aureus* COL infiziert und nach sechs Stunden Inkubation mit verschiedenen Antibiotikagaben therapiert. Nach 72 Stunden wurden die Tiere getötet, Organe entnommen und die Keimzahl bestimmt. Die Untersuchungen lieferten Daten zur Dosis, Gewebegängigkeit und *in-vivo*-Resistenzbildung.

Zunächst wurden unterschiedliche Organe entnommen und die Keimzahlen bestimmt. Dabei erwies sich die Niere als das Organ mit der höchsten Besiedelung. In Milz und Leber konnten dagegen auch in der Negativkontrolle keine verwertbaren CFU ermittelt werden. Obwohl *S. aureus* COL in einem vorbereitenden Schritt einmal durch die Maus passiert worden war, erreichte der Stamm nicht die Fitness eines Patientenisolates.

### C.11.1. Dosisfindung

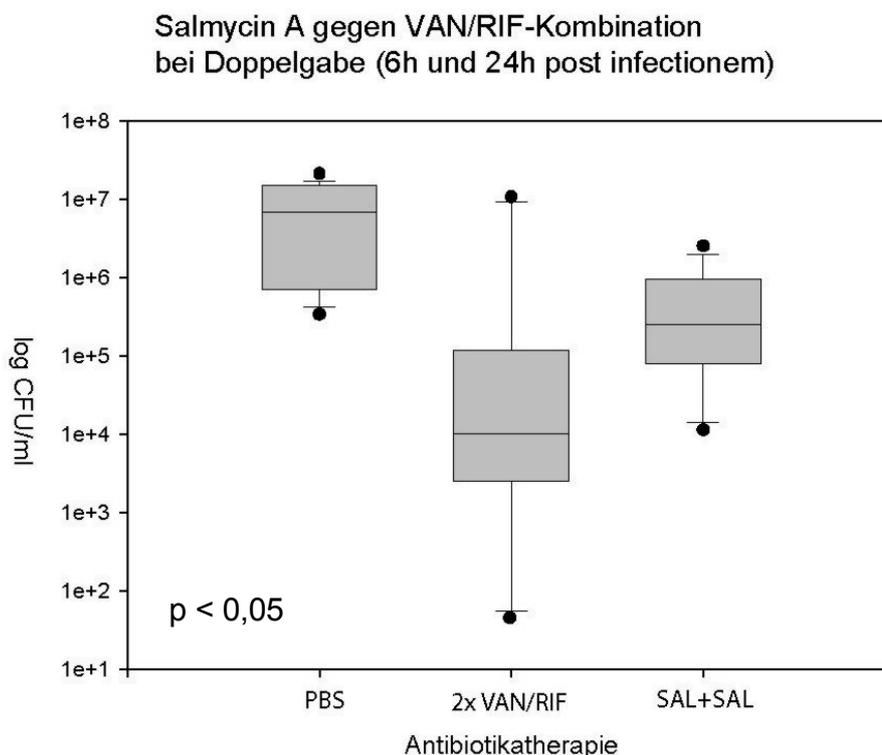
Die Höhe der Anfangsdosis in der ersten Versuchsreihe orientierte sich an den Versuchen zur *in-vivo*-Wirksamkeit von Albomycin (Pramanik et al., 2006) und entspricht einer Menge von 50 µg Salmycin A pro Maus. Bezogen auf das Körpergewicht entspricht dies einer Dosis von 2 mg/kg. Die Resultate im ersten Durchgang zeigten keine signifikante Verminderung der Keimzahl (nicht dargestellt). Daher wurde die Dosis im zweiten Durchgang auf 10 mg/kg (250 µg Salmycin A pro Maus) erhöht. Zudem wurden zwei weitere Gruppen eingeführt, die nach 24 Stunden eine zweite Salmycin- bzw. Vancomycindosis (weitere 250 µg je Maus) erhielten, um die Antibiotikakonzentration im Körper aufrecht zu erhalten. Eine Einzelgabe von 250 µg Salmycin pro Maus zeigte im Mittel keinen Effekt. Die doppelte Gabe führte bei Salmycin zu einer Reduzierung der Keimzahl von etwa 1,5 Zehnerpotenzen und war damit effektiver als die Vancomycin-Therapie. Auffällig ist, dass die Werte der Salmycingruppen stets eine hohe Streuung aufweisen und starke Ausreisser nach oben und unten auftreten (siehe Abb. 64).



**Abb. C64:** Logarithmische Darstellung der *in-vivo* gefundenen Keimzahlen von MRSA-Stamm COL im Box-Whisker-Plot. 10 Mäuse pro Gruppe, Antibiotika (10 mg/kg) wurden in 200 µl Volumen über die Schwanzvene appliziert. PBS=Kontrolle, SAL=Salmycin A 6 h post infectionem appliziert, SAL+SAL= Salmycin A nach 6 h und 24 h appliziert; identisch bei Vancomycin (VAN). Tiere wurden nach 72 h getötet und die CFU im Nierenhomogenisat bestimmt.

### C.11.2. Modifikation der Positivkontrolle

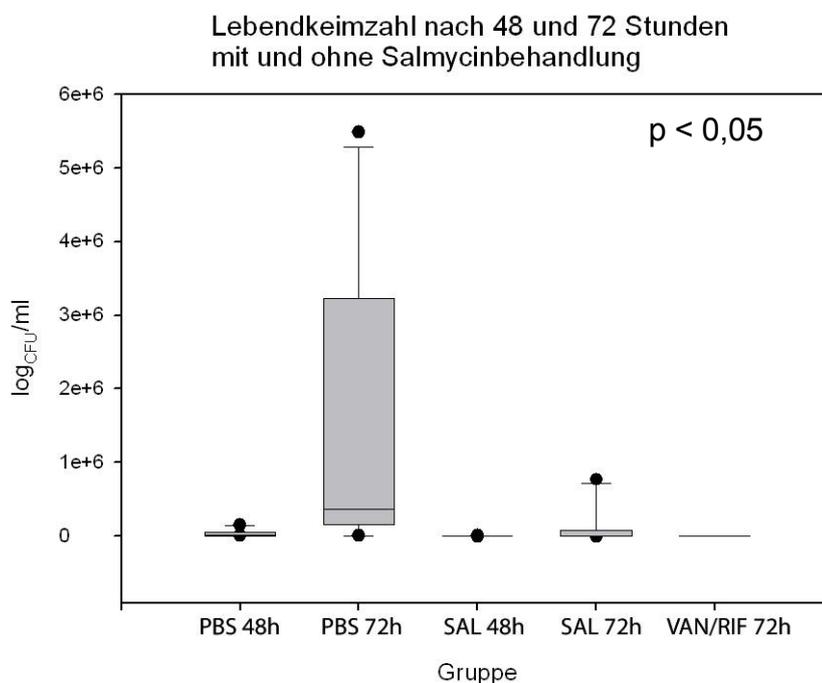
Die Auswertung des ersten Versuchslaufs zeigte, dass Vancomycin trotz ausreichender Dosis, nicht zur erwarteten Verminderung der Keimzahl führte (vgl. Abb. 64). Die Literaturrecherchen ergaben, dass Vancomycin eine schlechte Gewebegängigkeit aufweist, so dass in den Organen keine ausreichende Konzentration erreicht wird. Daher wurde in den Folgeversuchen eine Kombination von Vancomycin und Rifampicin als Positivkontrolle verwendet. Vor der Einführung von Linezolid stellte dieses Antibiotikaregime den Goldstandard für die Behandlung von MRSA dar. Die Kombinationstherapie von Vancomycin und Rifampicin zeigte einen weitaus stärkeren Effekt als Vancomycin allein (vgl. Abb. 65 und 67). Die Keimzahl wurde gegenüber der Negativkontrolle um nahezu drei Zehnerpotenzen vermindert. Trotzdem wurden im Gewebe noch hohe Keimzahlen angetroffen. Für die Positivkontrolle wurden weitaus geringere CFU erwartet. Es wird vermutet, dass bei der Vorbereitung zu niedrige Konzentrationen der RIF/VAN-Kombination hergestellt wurden, da in den Folgeversuchen stets eine vollständige Abtötung aller Keime erzielt wurde.



**Abb. C65:** Logarithmische Darstellung der *in-vivo* gefundenen Keimzahlen von MRSA-Stamm COL im Box-Whisker-Plot. 10 Mäuse pro Gruppe, Antibiotika wurden in 200 µl Volumen über die Schwanzvene appliziert. PBS= Kontrolle, SAL= Salmycin A 6 h post infectionem appliziert, SAL+SAL= Salmycin A nach 6 h und 24 h appliziert; identisch bei Kombinationstherapie (VAN/RIF). Tiere wurden nach 72 h getötet und die CFU im Nierenhomogenisat bestimmt.

Die Erhöhung der Salmycindosis auf 10 mg/ml Körpergewicht zeigte ebenfalls einen signifikanten Effekt in der Verminderung der Keimzahl im Vergleich zur PBS-Kontrolle von etwas über einer Zehnerpotenz. Sie erreichte jedoch nicht die Wirkung der Positivkontrolle. Hierauf können mehrere Faktoren Einfluss gehabt haben: denkbar ist, dass die zweifache Antibiotikagabe nicht zu einer vollständigen Abtötung ausreichte und nach der Konzentrationsabnahme des Antibiotikums eine Wiederbesiedlung der Organe stattfand. Ebenfalls vorstellbar ist, dass auch Salmycin eine schlechte Gewebegängigkeit besitzt und nicht ausreichend in Organe eindringt, oder dass es im Organismus zu schnell abgebaut wird um seine maximale Wirkung zu erzielen.

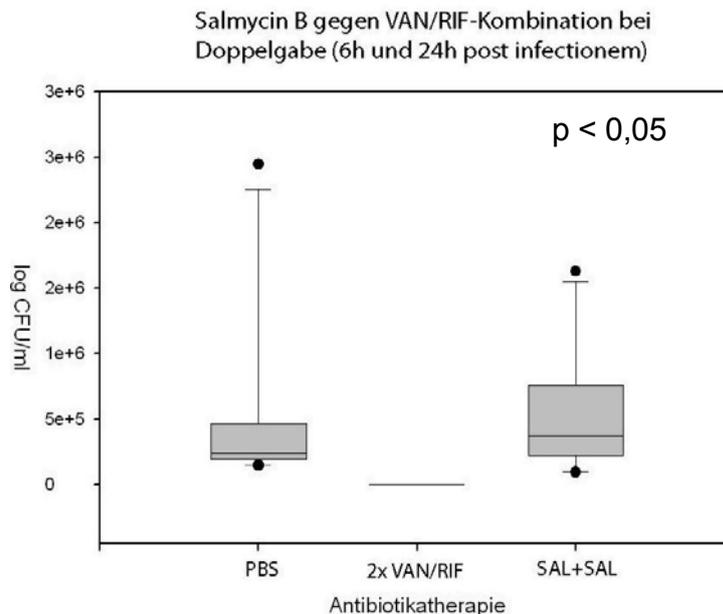
Zur Überprüfung der ersten Möglichkeit wurde in einem weiteren Versuch die Mäuse bereits 48 Stunden nach Inkubation getötet und die Lebendkeimzahlen in der Niere bestimmt. Aus Abb. C66 wird deutlich, dass auch nach der zweiten Salmycingabe genug Keime überleben, um die Infektion wiederaufflammen zu lassen. Der Vergleich der CFU-Zahlen von Negativkontrolle (PBS 48h) und Salmycin-Therapie (SAL 48h) zeigt, dass das Sideromycin eine Reduktion der Keimzahl um den Faktor 30 bewirkt, während die Kombinationstherapie von Vancomycin und Rifampicin (VAN/RIF 72h) zur vollständigen Eradikation der Infektion führt.



**Abb. C66:** Logarithmische Darstellung der *in-vivo* gefundenen Keimzahlen von MRSA-Stamm COL im Box-Whisker-Plot. 10 Mäuse pro Gruppe, Antibiotika wurden in 200 µl Volumen über die Schwanzvene appliziert. PBS= Kontrolle, SAL= Salmycin A 6 h und 24 h post infectionem appliziert; Tiere wurden nach 48 h bzw 72 h getötet, VAN/RIF dient als Positivkontrolle. CFU wurden im Nierenhomogenisat bestimmt.

### C.11.3. Salmycin B besitzt *in vivo* keine antibiotische Wirkung

Salmycin B zeigte *in vivo* bei gleicher Konzentration (10 mg/kg) keinen wachstumshemmenden Effekt. Tendenziell konnten in der Salmycin-Gruppe etwas mehr Keime gezählt werden als in der PBS-Kontrolle (siehe Abb. C67). Dagegen konnten in keiner Niere der Positivkontrollgruppe (VAN/RIF) Keime gefunden werden. Der Erwartungswert für diese Gruppe wurde daher erfüllt. Grund für die hohen CFU-Zahlen in der Salmycin-Gruppe ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Instabilität von Salmycin B bei physiologischem pH-Wert. Das als Abbauprodukt entstehende Danoxamin fördert zudem offensichtlich das Keimwachstum. Die postantibiotische Phase bis zur Tötung der Tiere wurde in diesem Versuch von 72 h auf 48 h verringert, um die Wahrscheinlichkeit einer Remission der Infektion zu minimieren.

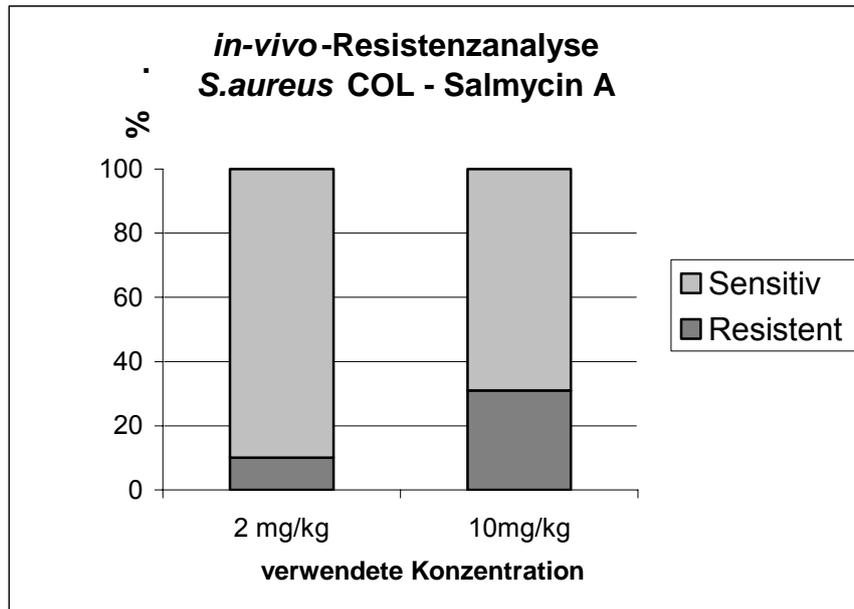


**Abb. C67:** Logarithmische Darstellung der *in-vivo* gefundenen Keimzahlen von MRSA-Stamm COL im Box-Whisker-Plot. 10 Mäuse pro Gruppe, Antibiotika wurden in 200 µl Volumen über die Schwanzvene appliziert. PBS=Kontrolle, SAL= Salmycin B 6 h post infectionem appliziert, SAL+SAL= Salmycin B nach 6 h und 24 h appliziert; identisch bei Kombinationstherapie (VAN/RIF). Tiere wurden nach 48 h getötet und die CFU im Nierenhomogenisat bestimmt.

### C.11.4. *in-vivo*-Resistenzbildung

Die auf den auszuzählenden Platten gewachsenen Kolonien wurden erneut auf Salmycinresistenz getestet, und analysiert, ob sich die überlebenden CFU aufgrund einer Resistenz im Organ ansiedeln konnten oder ob es sich um sensitive Keime handelt, die sich aufgrund zu geringer Konzentration halten konnten.

Es wurden 110 CFU aus dem Versuchslauf 1 (2mg/kg Salmycin A) und 105 CFU aus Versuchslauf 2 (10 mg/kg Salmycin A) im Bioassay auf Salmycinsensitivität getestet.



**Abb. 68:** Resistenzanalyse der in der Niere gefundenen CFU aus zwei Versuchsreihen in Prozentangaben;  $n_{2\text{mg/kg}} = 110$ ,  $n_{10\text{mg/kg}} = 105$ , getestet im Bioassay gegen Salmycin A (1 mg/ml) auf NB + 200  $\mu\text{M}$  DPD.

Während in der geringeren Dosis rund 10 % der Keime eine Salmycinresistenz aufwiesen, waren es bei der höheren Konzentration bereits 31 %. Die Auszählungen wurden jeweils nur einfach durchgeführt, so dass die in Abb. 68 erkennbare Tendenz nur bedingte statistische Aussagekraft besitzt. Sie geben einen Hinweis darauf, dass der Abbau von Salmycin im Organismus zu einem erhöhten Spiegel an verwertbarem Eisen führt, welches das Wachstum von *S. aureus* fördert und die Resistenzbildung beschleunigt.

## D. Diskussion

Angesichts der Zunahme multiresistenter Keime und der abnehmenden Zahl zuverlässig wirksamer Antibiotika, stellt die Suche nach effektiven Substanzen gegen Pathogene heute eine Aufgabe von hoher Dringlichkeit dar (Spellberg et al., 2004; Boggs & Miller, 2004). Um dieser Entwicklung in der Zukunft begegnen zu können, sind innovative Lösungsansätze gefordert, die auch abseits der bisher beschrittenen Pfade gesucht werden müssen: Es bedarf der Erforschung neuartiger Substanzen, neuer Targets, sowie neuer Wege der Wirkstoffeinschleusung in Pathogene.

Sideromycine bieten aufgrund ihrer Eigenschaften einen interessanten und viel versprechenden Ansatz. Die Eisenaufnahme stellt in diesem Zusammenhang einen aussichtsreichen Angriffsort der Bakterienzelle dar, da Eisen bei nahezu allen Spezies die Regulation des Zellstoffwechsels und die Funktion zahlreicher Enzyme mitbeeinflusst (Braun & Hantke 2007). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von verwertbarem Eisen sind die Strategien, die Bakterien zur Eisenaufnahme entwickelten sehr aufwendig und energieintensiv. So verfügt *S. aureus* beispielsweise über sieben verschiedene Aufnahmesysteme für unterschiedliche Eisenquellen (Maresso & Schneewind, 2006). Genetische Untersuchungen zeigen, dass rund 1 % des gesamten genomischen Materials von *E.coli* Eisenaufnahmesystemen zuzuordnen ist (Skaar et al., 2004). Da Sideromycine bakterieneigene Moleküle der Eisenakquisition imitieren und nach dem Prinzip des "Trojanischen Pferdes" durch dieselben spezifischen Transportsysteme aufgenommen werden, entfalten sie ihre antibiotische Aktivität äusserst zielgerichtet und mit hoher Wirksamkeit (Braun, 2002; Budzikiewicz, 2001). Neben dem bereits gut untersuchten Albomycin gibt es zahlreiche weitere antimikrobiell wirksame Eisenchelat-Bildner (Braun 2002 & 1999; Diarra et al., 1996; Miller et al., 1991; Vorisek & Grunberger, 1966; Bickel et al., 1966; Yamada & Kawaguchi, 1964; Sackmann et al., 1962; Gause, 1955). Das von *Streptomyces violaceus* synthetisierte Salmycin imitiert ein Ferrioxamin-ähnliches Eisenhydroxamat. Die Untersuchung seiner Produktionsbedingungen, sein Wirkspektrum, das genutzte Aufnahmesystem, die Natur der Resistenzbildung und seine *in-vivo*-Effekte sollen im kommenden Abschnitt diskutiert werden.

## D.1. Salmycinaufreinigung

Wie bei allen mikrobiell synthetisierten Antibiotika liegt auch bei der Herstellung von Sideromycinen das anspruchsvollste Problem in einer für pharmazeutische Zwecke kostengünstigen Fermentation. Ein attraktiver Ansatz hierfür ist die Identifikation der für die Biosynthese verantwortlichen Gencluster, so dass eine Modifizierung der Syntheseregulation angestrebt und eine langwierige Klonselektion vernachlässigt werden kann (McHenney et al., 1998; Peirú et al., 2005). In der Tat stellte das Produktionsverhalten von DSM8286 für die Aufreinigung von Salmycin für diese Arbeit eine stetig wiederkehrende Hürde dar. Produzierende Klone wurden in regelmässigen Abständen neu selektiert, da die zuvor genutzte Charge nach einigen - in der Regel drei bis sechs - Fermentationszyklen die Salmycinproduktion stark verringerte oder einstellte. Dieser Effekt ist bekannt und nicht ungewöhnlich für Streptomyceten. Gene des Sekundärstoffwechsels gehen wegen des linearen Aufbaus des Streptomyceten-Genoms häufig spontan verloren. So weisen durchschnittlich etwa 0,5 % aller Sporen Deletionen auf (Redenbach et al., 2000). Insofern wäre eine logische Weiterentwicklung, die entsprechenden Synthesecuster zu identifizieren und in transferierbare Vektoren zu klonieren. Die Salmycinproduktion würde hinsichtlich der Produktionsparameter und der Ausbeute dadurch weitaus berechenbarer.

In dieser Arbeit wurde ein Vergleich des aus der Arbeit von Vertésy et al. (1995) übernommenen undefinierten Soja-Mannitol-Mediums mit dem von Fiedler (1985) vorgeschlagenen synthetischen Medium für die Albomycinproduktion angestrebt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des definierten Mediums die Produktion von Salmycin erhöhte. Der Ersatz des undefinierten Mediums durch ein Mangelmedium hat den Vorteil, eine gezielte Supplementation mit Nährstoffen durchführen zu können. Zu reichhaltiges Medium unterdrückt hingegen die Expression von Sekundärstoffwechselprodukten. Die Zugabe einer Eisenquelle wie Eisenchlorid, sowie die Supplementation mit Ornithin führten zu einer deutliche Steigerung der Salmycinproduktion. Dies ist insofern nachvollziehbar, als dass eine Produktion der Siderophore sehr häufig durch eisenregulierte DtxR-ähnliche Repressorproteine gesteuert wird (Günter-Seeboth & Schupp 1995). Bei *Streptomyces coelicolor* wurden in diesem Zusammenhang die Repressorproteine DmdR1 und DmdR2 identifiziert (Flores & Martin, 2004). Eine Steigerung der

Syntheserate durch Ornithin und Lysin wurde schon bei anderen Hydroxamatsiderophorfermentationen beobachtet. So konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Ornithin als Baustein für die Synthese des Hydroxamatrings verwendet wird (Barona-Gomez et al., 2005; Walz, 1985).

### **D.2. Intrinsische Eigenschaften von Salmycin und ihre Effekte**

Bereits im Verlauf der Produktions- und Aufreinigungsphase konnte eine Eigenschaft des Sideromycins beobachtet werden, die Einfluss auf viele darauf folgende Untersuchungen hatte. So konnte gezeigt werden, dass Salmycin nach 48 Stunden Fermentation in maximaler Konzentration im Produktionsmedium zu finden ist. Das Produktionsmaximum von Albomycin wird im Vergleich dazu erst nach etwa 96 Stunden erreicht (Pramanik, 2006). Allerdings nimmt die messbare Menge an Salmycin im weiteren Fermentationsverlauf kontinuierlich ab. Dies scheint einerseits im Zusammenhang mit dem pH-Wert des Mediums, andererseits aber auch mit einer intrinsischen Instabilität des Moleküls zu stehen. Die Entfernung des Eisenmoleküls aus dem Danoxamin-Anteil durch Hydroxychinolin- oder Chelex-Behandlung führte stets zu einem Zerfall des Sideromycins. Ebenso zeigten HPLC-gereinigte Salmycinproben wenige Tage nach erneutem Lösen eine Abnahme der antimikrobiellen Wirkung, welche nur durch eine fortschreitende Hydrolyse des Moleküls erklärt werden kann. Dies wurde durch die HPLC-Analyse bestätigt. Es ist denkbar, dass mehrfaches Aussetzen einer pH-Änderung durch Umlösen und Aufkonzentration im Rotationsverdampfer bei Temperaturen um 50°C den Hydrolyseprozess zusätzlich beschleunigen. Die hohen Verluste während der Aufreinigung wären dadurch zu erklären.

Die beobachteten Effekte unterstützen die von Miller (2000) vorgeschlagene Hypothese, dass das Eisenatom nach der Aufnahme von Salmycin in die Prokaryotenzelle durch einen vermutlich enzymatischen Vorgang entfernt wird, wodurch das bakterizide Aminodissaccharid autolytisch vom Siderophoranteil abgespalten wird. Bei *E. coli* ist ein homologer Vorgang der Reduktion von Ferrichrom durch das cytoplasmatische Protein FhuF bereits bekannt (Matzanke et al., 2004; Müller, 1997). Für Albomycin wurde eine intrazelluläre Aktivierung in *E. coli* und *S. typhimurium* durch Peptidase N bereits nachgewiesen (Braun et al. 1983). In

den Originalarbeiten von Vértésy et al. (1995) werden ebenfalls unterschiedliche pH-Bereiche beschrieben, in denen die Salmycin-Derivate stabil bleiben. Eine Schwachstelle des Salmycinmoleküls stellt dabei wahrscheinlich die Verknüpfung des Siderophors mit dem Aminodisaccharid über eine leicht hydrolysierbare Esterbindung dar. Während der Aufreinigung über HPLC wurde versucht, diesen Eigenschaften gerecht zu werden, indem im sauren pH-Bereich gearbeitet wurde. Ein grosser Anteil des Rohprodukts ging jedoch bereits während der Säulenchromatographie im Molekularsieb verloren. Hier wäre denkbar, bei der Aufarbeitung zukünftig mit gepufferten Lösungsmitteln zu arbeiten und niedrigere Temperaturen einzuhalten.

Für den Fermentationsprozess wäre in weiteren Untersuchungen zu klären, ob eine kontrollierte Salmycinproduktion im pH-Bereich 6,5 - 6,8 zu höheren Ausbeuten führt. Grundsätzlich jedoch wird die Problematik hierbei lediglich auf einen späteren Zeitpunkt hinausgezögert: Eine pharmazeutische Anwendung von Salmycin im physiologischen pH-Bereich kann durch die Instabilität der Substanz erschwert sein.

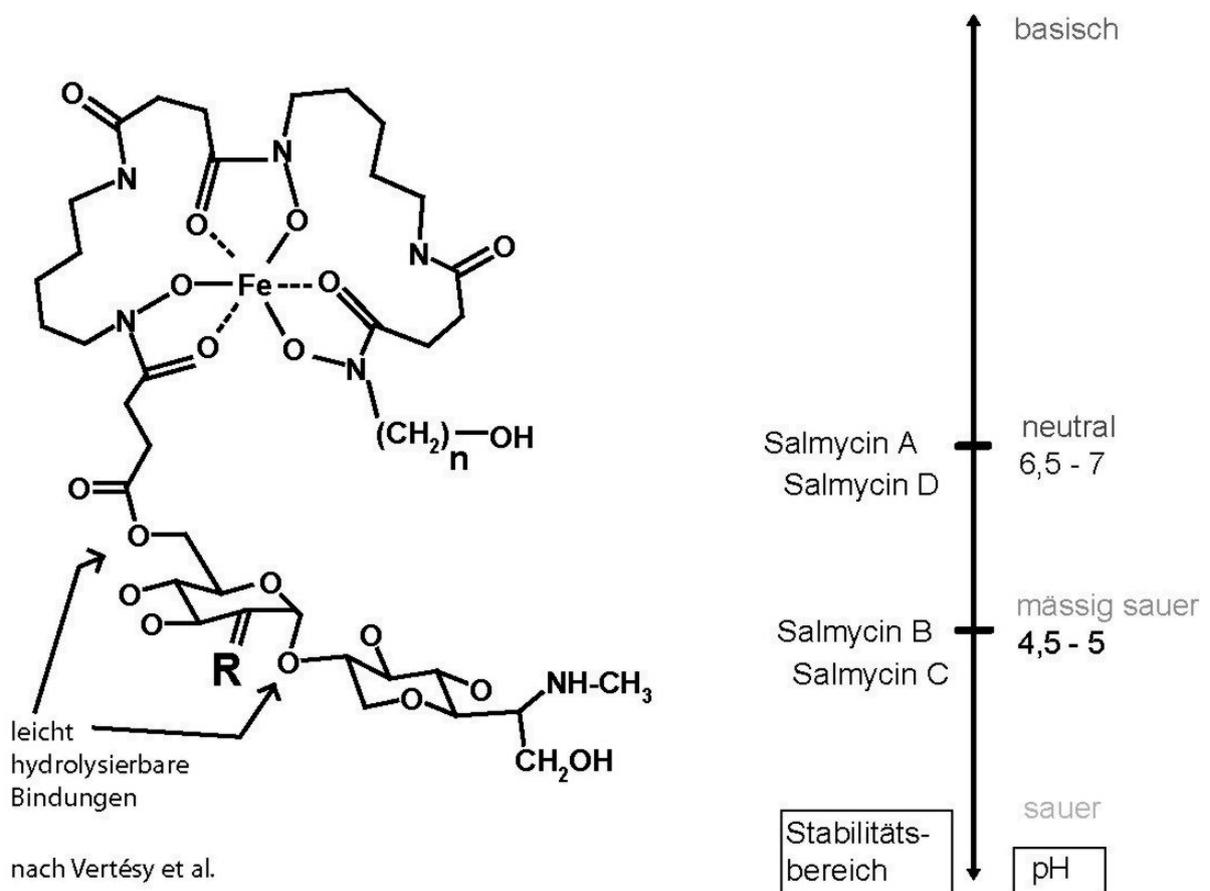


Abb. D1: Salmycin – Molekülstruktur und Stabilitätsbereich der Derivate.

### D.3. Wirkspektrum und minimale Hemmkonzentration

Salmycin ist ein Antibiotikum mit engem Wirkspektrum, welches hauptsächlich die Gruppe der Gram-positiven Keime umfasst. Hierin ähnelt es dem Ferrimycin (Zähler, 1976; Bickel et al. 1960) und unterscheidet sich von Albomycin, welches auch gegen zahlreiche Gram-negative Spezies bakterizid wirkt (Pramanik, 2006). Die Wirkung gegen ein enges Spektrum Gram-positiver Bakterien war aus den Originalarbeiten von Vértesy et al. (1995) bereits bekannt.

Die ermittelten Hemmkonzentrationen bei *S. aureus* variierten, bewegten sich jedoch *in vitro* weit unter den Konzentrationen herkömmlicher Antibiotika. Insbesondere multiresistente *S. aureus*-Varianten (VRSA und MRSA) zeigten sich äusserst sensitiv. Die ermittelte MHK von 4 – 8 ng/ml liegt um den Faktor 1000 – 500 niedriger als die MHK von Vancomycin oder Gentamicin. Der Laborstamm RN6390 zeigte eine um den Faktor 129 stärkere Sensitivität. Für das Patientenisolat VA24500 wurde der Faktor 32 errechnet. Diese Werte zeigen deutlich die überlegene Wirksamkeit von Sideromycinen hinsichtlich ihrer Wirkung gegen Problemkeime im Vergleich zu gängigen Antibiotika (Braun, 1999).

In dieser Arbeit konnte erstmalig beschrieben werden, dass einige Gram-negative Spezies durchaus eine Sensitivität gegen Salmycin zeigen. Ein standardisierter Plattendiffusionsassay erwies sich als zuverlässiges und rasches Testverfahren.

*K. pneumoniae*, *E. cloacae* und *H. alvei* zeigten als Laborstämme deutliche, *Y. enterocolitica* und *C. freundii* eine teilweise Sensitivität gegen Salmycin. Alle sind fakultativ anaerobe Bewohner der Darmflora und können als Pathogene in Erscheinung treten. Als Verursacher von Harnwegsinfekten, Gastroenteritis, Pneumonien, aber auch Urosepsis und Septikämien, ist ihr Anteil am Erregerspektrum vor allen in Krankenhäusern bedeutend hoch. Insbesondere für alte oder immungeschwächte Patienten stellen sie ein hohes Risikopotenzial dar. Das Vorhandensein eines Ferrioxamin-Transporters konnte bei *K. pneumoniae*, *Ent. cloacae* und *H. alvei* über Bioassays bereits nachgewiesen werden (Rabsch & Winkelmann, 1991), über *C. freundii* konnten diesbezüglich keine Daten gefunden werden, doch die Sensitivität sowohl gegen Salmycin als auch Ferrimycin spricht sehr dafür. Andere Spezies wie *Salmonella* und *Erwinia* zeigten trotz eines

nachgewiesenen FoxA-Rezeptors im Bioassay keine Salmycinsensitivität (Kingsley et al., 1999; Deiss et al., 1998).

Nachdem das Ferrioxamin-Aufnahmesystem als für den Salmycin-Transport verantwortlich identifiziert werden konnte, wurde die Verbreitung von Ferrioxamintransportern bei den *Enterobacteriaceae* untersucht. Mit dem phylogenetischen Stammbaum wurde die Verteilung von Hydroxamataufnahmesystemen innerhalb der *Enterobacteriaceae* dargestellt. Die aus der  $\beta$ -Untereinheit der F-ATPase errechnete Topologie gibt die momentan gültige Einteilung der *Enterobacteriaceae* sehr gut wieder (Paradis et al., 2005; Dauga, 2002). Tatsächlich besitzen sehr viele Arten innerhalb dieser Familie die Fähigkeit zur Hydroxamataufnahme. Wider erwarten gruppierten sich Salmycin-sensitive Spezies nicht zusammen. Diese Indizien, sowie das starke Schwanken in der Sensitivität von Isolaten derselben Art (z.B. *Yersinia enterocolitica*) gaben Anlass zu der Vermutung, dass eine Resistenz zahlreicher Gram-negativer Arten sich nicht allein durch das Fehlen eines Ferrioxamin-Aufnahmesystems erklären lässt.

Die durchgeführten Sensitivitätstests dienten in erster Linie zur Orientierung der Anwendbarkeit von Salmycin gegen klinisch relevante Keime. Hierbei wurde hauptsächlich auf rasch verfügbare Isolate zurückgegriffen, wobei einige Pathogene nicht berücksichtigt werden konnten, obwohl deren Überprüfung durchaus sinnvoll wäre: Insbesondere Gram-positive Keime der Gruppen *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium* oder *Corynebacterium*, die aufgrund ihrer Pathogenität oder erschwerten Anzucht bislang fehlen, sollten in kommende Untersuchungen einbezogen werden.

Die Frage warum manche Streptomyceten Sideromycine bilden bleibt spekulativ. Alle bisher untersuchten Streptomyceten sind als Produzenten und Nutzer von Hydroxamat-Siderophoren bekannt (Bunet et al., 2007). Es ist daher denkbar, dass bei der Synthese von Sideromycinen eine Doppelstrategie zum Einsatz gelangt:

Der Produzentenstamm ist unempfindlich gegen die Substanz und kann sie als Eisenquelle nutzen. Konkurrierende Mikroorganismen (andere Streptomyceten und bakterielle Destruenten) sind zur Aufnahme von Salmycin fähig oder nicht. In beiden Fällen werden die Konkurrenten im Wachstum gehemmt, sei es wegen der Toxizität des Salmycins oder wegen des Eisenmangels welchen es in der Umgebung hervorruft.

#### D.4. Aufnahmesysteme

Wegen des Danoxamin-Anteils von Salmycin wurde eine Aufnahme über das Hydroxamataufnahmesystem vermutet. Transport-Assays mit *B. subtilis* und *S. aureus* konnten dies eindeutig bestätigen. Wie Albomycin lässt Salmycin sich als Indikator für das Vorhandensein eines Ferrioxamintransportsystems nutzen (Ferguson et al., 2000; Rohrbach et al., 1995; Killmann und Braun, 1992; Köster und Böhm, 1992; Braun et al., 1991).

In dieser Arbeit wurden von *S. aureus* RN6390 und VA24500 jeweils der gesamte *fhuCBG*-Aufnahme-Komplex sowie *fhuD2* sequenziert. Die Sequenzen entsprechen bei beiden Stämmen exakt der Genomsequenz. Für den Stamm MW2 wurden bereits Fur-Box, Promotor und den für die Lipoproteine typischen Lipo-Box identifizieren (Sebulsky et al., 2003 & 2004), welche durch diese Arbeit bestätigt werden konnten. Zunächst wurde versucht, Mutationen im FhuCBG-Komplex bei spontanresistenten Kolonien über einen Mutations-Detektions-Kit (EpiCentre™) aufzuspüren. Dieser erste Ansatz hätte bei einem Erfolg die Lokalisation der Mutation im 2,96 kb grossen Komplex erleichtert und die Anzahl analysierbarer Mutanten erhöht. Im Versuch konnte jedoch stets nur eine Schmierbande beobachtet werden, während die Kontrolle stets das erwartete Ergebnis lieferte. Da Fehler während der PCR durch Kontrollgele ausgeschlossen wurden, mag eine Ursache ein zu langes Fragment oder ein falsches Verhältnis Template-DNA : Mutanten-DNA gewesen sein, welches den Hybridisierungsvorgang ungünstig beeinflussen kann.

Über die alternativ durchgeführte Sequenzierung konnten einige Mutationen in spontanresistenten Isolaten nachgewiesen werden. Eine Analyse der Sequenzen zeigte, dass es sich stets um Punktmutationen einzelner Nukleotide – entweder eines A oder eines T – handelte, die zu einer Verschiebung des ORFs und zu einem daraus resultierenden Abbruchs der Translation führten. Zwei Mutationen konnten in *fhuB* (Deletionen), zwei weitere in *fhuC* (Insertionen) gefunden werden. Auffällig bei allen Mutanten war, dass die Mutationen am Sequenzanfang auftraten. Dies führt zu einem Totalausfall des jeweiligen Proteins und damit zu keiner Hydroxamataufnahme, wodurch sich die beobachtete Kreuzresistenz von Salmycin und Albomycin erklärt. Durch die Resultate der Sequenzanalysen konnte somit die Vermutung bestätigt werden, dass bei allen Mutanten der Ausfall des Transporters

Ursache der Resistenzbildung ist. Natürlich muss hierbei bedacht werden, dass der Versuchsansatz eine entscheidende Fehlerquelle enthalten kann: Die Auswahl der Mutanten erfolgte aufgrund von Plattendiffusionstests nach subjektiven Kriterien. Somit ist es möglich, dass Mutanten gewählt wurden, die eine eindeutige Resistenz zeigten und nicht solche mit einer etwas schwächeren ausgeprägten Resistenz. Es ist also durchaus vorstellbar, dass noch andere Typen der Resistenzbildung vorliegen, die jedoch bei der Auswahl der Testmutanten keine Beachtung fanden.

Mutationen die zu einer Salmycinresistenz unter Beibehaltung einer Albomycinsensitivität führten, wurden sehr selten (< 1 % aus 500 Testisolaten) beobachtet. In zwei von drei Fällen handelte es sich um intermediär resistente Isolate, die in späteren Bioassays revertierten. Bei der Überprüfung ihrer Sequenzen wurde sowohl in *FhuCBG* als auch in *FhuD2* keine Mutation festgestellt. Die Reversion der Isolate wurde nicht weiter untersucht. Somit ist unklar, wodurch der beobachtbare Effekt hervorgerufen wurde. Es könnten Salmycin-inaktivierende Enzyme gewesen sein, die durch Änderung der Anzuchtbedingungen – etwa durch Lagerung auf Platte - nicht mehr exprimiert wurden oder sich tatsächlich um eine genetische Reversion gehandelt haben. Die Mutante SAL83 zeigt eine eindeutige Salmycinresistenz, blieb aber weiterhin Albomycin-sensitiv. Die Sequenzierung des *fhuCBG*-Operons ergab keine Mutation. Dagegen zeigte die Analyse der *fhuD2*-Sequenz bei SAL83 eine Deletion von 10 Nukleotiden nahe des C-Terminus (Pos. 841 – 851). Das Protein wird dabei um 18 Aminosäuren verkürzt. Interessanterweise zeigte die Mutante trotzdem eine dem Wildtyp gleichende Transportrate für Ferrioxamin. Dies lässt den Schluss zu, dass bei SAL83 Salmycin als Substrat nicht mehr erkannt wird, wohl aber Ferrioxamin. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Salmycinerkennung bei *FhuD2* am C-Terminus lokalisiert ist.

Anhand der *S. aureus*-Mutanten mit deletiertem *FhuD1* und/oder *FhuD2* konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Bindeproteine unterschiedliche Affinitäten zu Ferrichrom und Ferrioxamin besitzen (Heinrichs et al., 2003 & 2004). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *FhuD2* Salmycin als Substrat erkennt, nicht jedoch *FhuD1*. Parallel dazu konnten im Hydroxamataufnahmesystem von *B. subtilis* (Schneider & Hantke, 1993) ähnliche Verhältnisse nachgewiesen werden. Die Erkennung und Aufnahme von Salmycin und Ferrimycin wird durch das

Lipobindeprotein YxeB vermittelt, während FhuD hierbei keine Rolle spielt. Das Vorkommen zweier identischer Membrankomplexe mit gleichem Transportverhalten innerhalb verschiedener Spezies zwingt zu der Annahme, dass die unterschiedliche Affinität zu den Sideromycinen keine einmalige evolutionäre Fehlentwicklung darstellt, sondern einen Zweck verfolgen muss. Sebulsky & Heinrichs (2001) postulierten eine Genduplikation als Erklärung für das doppelte Vorkommen der FhuD-Lipoproteine bei *S. aureus*, ohne jedoch eine Erklärung dafür geben zu können. Es muss angenommen werden, dass neben *B. subtilis* auch nahe verwandte Spezies über eine derartige Zusammensetzung des Transportsystems verfügen. Die Duplikation muss somit entweder mehrfach analog oder aber zu einem sehr frühen Zeitpunkt stattgefunden haben. Die Sequenzanalyse über das BLAST-Verfahren konnte zeigen, dass alle vier Sequenzen von *S. aureus* und *B. subtilis* lediglich zu 30% (*B. subtilis* zu *S. aureus*) bis 40% (*S. aureus* zu *S. aureus*) identisch sind. Diese geringe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen weist auf ein sehr frühes Duplikationsereignis hin, schliesst die zweite erwähnte Möglichkeit jedoch nicht aus. Eine Hypothese wäre, dass tatsächlich eine evolutionär betrachtet „alte“ Duplikation der FhuD-Bindeproteine vorliegt. Diese konnte sich bis heute durchsetzen, da sie dem Bakterium den Vorteil brachte, eine grössere Zahl unterschiedlicher Siderophore zu erfassen. Dass dies tatsächlich der Fall ist, unterstützt der Nachweis unterschiedlicher Affinitäten zu Albomycin, Ferrimycin und Salmycin.

Der in dieser Arbeit benutzte Transportassay mit radioaktiv markierten Siderophoren wurde für die Erkennung einer Salmycinaufnahme modifiziert. Da Salmycin nicht in eine eisenfreie Form überführbar war, wurde ein kompetitiver Versuchsansatz gewählt, in dem zu den radioaktiv markierten Siderophoren das Sideromycin im Verhältnis 1:1,3 zugegeben wurde. Somit konnte die Differenz in der Transportrate mit und ohne Sideromycin erfasst werden. Da Siderophore und Sideromycine in antagonistischer Weise um die Transportsysteme konkurrieren (Braun & Braun, 2002; Knüsel & Nüesch, 1965), erwies sich das Verfahren insbesondere bei der Untersuchung der Gram-negativen Teststämme als hilfreich, lieferte es doch quantifizierbare Ergebnisse. Die Bindungsassays über SDS-PAGE und Western Blot sollten die Erkennung von Salmycin als Substrat von FhuD<sub>2S.aureus</sub> und FhuD<sub>E.coli</sub> bestätigen. Tatsächlich konnten im SDS-PAGE in beiden Fällen ein Schutz vor Verdau durch Bindung von Salmycin und anderen Siderophoren gezeigt werden.

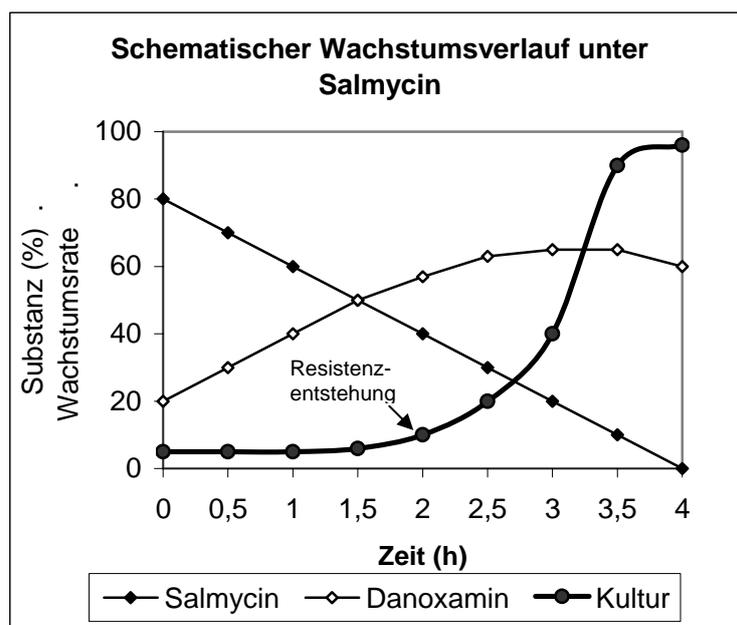
## D.5. Gram-negative Keime und Resistenz

Bislang war nicht geklärt, ob die weitgehende Salmycinresistenz der Gram-negativen Bakterien lediglich auf das Fehlen eines geeigneten Transporters der äusseren Membran beruht. Vielmehr konnten Defekte in unterschiedlichen Elementen des Transmembrankomplexes, sowie intrazellulär modifizierenden Enzyme weitere Ursachen für die Unempfindlichkeit der Bakterien gegen Salmycin sein. *E.coli* ist zwar in der Lage, Ferrichrom über das Fhu-System aufzunehmen, Ferrioxamin wird aber kaum darüber aufgenommen. Ferrioxamin wird jedoch in geringer Konzentration über den Coprogen-Transporter FhuE über die äussere Membran transportiert (Sauer et al., 1987). *E.coli* war in den Versuchen stets Salmycin-resistent, da FhuE Salmycin nicht als Substrat erkennt. *Yersinia enterocolitica* dagegen besitzt einen spezifischen Hydroxamattransporter in der äusseren Membran (Forman et al., 2007; Perry, 2004; Bäumlner & Hantke, 1992). Dies erklärt die – zumindest teilweise – vorhandene Sensitivität gegen Salmycin. Durch die Klonierung des Transportproteins (FoxA<sub>Yers.</sub>) in *E.coli* konnte diesem die Fähigkeit zur Ferrioxaminaufnahme, sowie Salmycinsensitivität verliehen werden. Diese Versuchsreihen zeigten, dass die äussere Membran Gram-negativer Bakterien eine effektive Barriere gegen Salmycin darstellt. Somit lässt sich schliessen, dass die Resistenz nicht im Wirkort gründet, sondern in erster Linie im Aufnahmemechanismus. Durch Komplementation von *K. pneumoniae* mit FoxA<sub>Yers.</sub> konnte auf identische Weise Salmycinsensitivität auf spontan entstandene transportdefiziente Isolate von *K. pneumoniae* übertragen werden. Da zahlreiche Teststämme ein Hydroxamat-Aufnahmesystem besitzen, Ferrioxamin als Eisenquelle nutzen und trotzdem Resistenz zeigen, legt den Schluss nahe, dass ein weiterer Mechanismus hierbei eine Rolle spielt. Da das Periplasma einen Pool für Nährstoffe darstellt, werden zahlreiche Enzyme über die Cytoplasmamembran dorthin sekretiert. Daher sind enzymatische Spaltungsreaktionen naheliegend, welche das in den periplasmatischen Raum geschleuste Salmycin rasch degradieren. Der oftmals beobachtete Wachstumseffekt, insbesondere bei den *Enterobacteriaceae*, lässt auf eine Aufnahme des entstandenen Danoxamins schliessen. In Untersuchungen von *Enterobacter cloacae* konnten bei mehr als 90 % aller Patientenisolate die Aktivität von cytoplasmatischen Fe(III)-Reduktasen nachgewiesen werden, deren Substrate neben Ferrioxamin B auch Ammoniumcitrat und Lactoferrin sind (Lisiecki & Muckcuki, 2006).

## D.6. Resistenzbildung

Bei nahezu allen Salmycin-sensitiven Keimen zeigten sich im Plattendiffusionstest einzelne, im Hemmhof wachsende Kolonien; sehr häufig traten sie im äusseren Hofbereich auf. Andere Teststämme wiesen einen trüb überwachsenen Hof auf, andere zeigten ein Wachstum von innen her. Bei *S. aureus* ergab die Analyse in den Hemmhöfen wachsenden Kolonien stets einen Defekt des Transporters. Nahezu alle Resistenten wiesen eine Kreuzresistenz zu Albomycin auf und waren nicht mehr in der Lage, Ferrioxamin und Ferrichrom als Eisenquelle zu nutzen.

Während den Untersuchungen zur minimalen Hemmkonzentration konnte gezeigt werden, dass die Resistenzbildung durch die Hydrolyse von Salmycin stark beschleunigt wird. In der Wachstumskurve mit hydrolysiertem Salmycin schlägt sich dies durch den auftretenden Retardierungseffekt nieder. Das noch vorhandene aktive Salmycin und das durch Zerfall entstandene Danoxamin konkurrieren um die Aufnahme in die Zelle. Die Kultur wird durch eine niedrige Salmycinkonzentration im Wachstum unterdrückt, gleichzeitig fördert die Supplementation von Danoxamin eine raschere Generationszeit. Unter diesen Bedingungen überwachsen Ferrioxamin-Transportmutanten den sensitiven Elternstamm. Diese Mutanten beginnen in der Regel nach sechs bis acht Stunden die Kolonie zu überwachsen und normaler Wachstumsverlauf setzt ein (s. Abb. D2).



**Abb. D2:** Schematische Darstellung der Relation Salmycin/Danoxamin zu einsetzendem Bakterienwachstum.

Fällt das Fhu-System durch eine Mutation im Membrankomplex aus, ergibt sich für *S. aureus* wahrscheinlich kein Nachteil. Die Spezies besitzt insgesamt sieben unterschiedliche Eisentransportsysteme (Maresso & Schneewind, 2006), so dass der Ausfall eines Aufnahmesystems über die Aufnahme anderer Eisenquellen kompensiert werden kann.

Bei Gram-negativen Keimen haben mehrere Faktoren auf die Resistenzbildung Einfluss. Die Untersuchung des Wachstumsverlaufs unter Salmycineinfluss konnte zeigen, dass mehrmalige Gaben von Salmycin das Wachstum von *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* beschleunigten. Gleichzeitig stieg die Zahl der resistenten Keime deutlich an. Während bei *Klebsiella* nahezu ausschliesslich Kreuzresistenz zu Albomycin auftrat, wies *Enterobacter* tendenziell eher eine auf Salmycin begrenzte Resistenz auf. In weiteren Versuchen gelang es, transportdefiziente Mutanten von *Klebsiella* mit  $\text{FoxA}_{\text{Yers}}$  zu komplementieren und die Sensitivität gegen Salmycin wieder herzustellen. Damit war der Nachweis über die Ursache der Salmycinresistenz von *K. pneumoniae* erbracht,

Bei *Hafnia alvei* konnte keine Beschleunigung des Wachstums festgestellt werden. Dieser Keim weist eine sehr hohe Sensitivität gegen Salmycin auf, was hauptsächlich auf das langsamere Wachstum zurückzuführen ist. Dies erklärt auch, weshalb mehrfache Salmycin-Gaben zu geringerer Resistenzbildung führen. Aus den Untersuchungen zur Resistenzbildung konnte der Grundsatz formuliert werden, dass die Resistenzbildung umso rascher verläuft, je kürzer der Generationszyklus des Bakteriums ist.

Anhand der vorliegenden Daten muss davon ausgegangen werden, dass die äussere Membran für Salmycin eine effektive Barriere darstellt, welche nur durch spezifische Ferrioxamintransporter überwunden werden kann. Die äussere Membran ist jedoch nicht der einzige Schutzmechanismus gegen Salmycin. Vermutlich bewirken bestimmte Enzyme im Periplasma eine Inaktivierung von Salmycin. Zahlreiche periplasmatische Enzyme insbesondere Reduktase, aber auch Esterasen und Glucosidasen sind in der Lage, durch einen Angriff der Esterbindung eine rasche Hydrolyse von Salmycin zu katalysieren (vgl. Abb. D1). Daher ist denkbar, dass das Periplasma Gram-negativer Bakterien als Entgiftungsraum für Salmycin dient.

Es ist auffällig, dass die Patientenisolate stets Resistenz zeigten während die Laborstämme derselben Spezies Salmycin-sensitiv waren. Die Ursachen hierfür sind unklar. Möglich ist, dass die Laborsstämme durch lange Lagerung und Kultivierung auf Labormedien in ihren Stoffwechseleigenschaften degeneriert sind. Die Salmycinsensitivität wäre dadurch erklärbar, dass spaltende Enzyme im Peri- oder Cytoplasma fehlen und das Sideromycin nach der Aufnahme in die Zelle länger aktiv bliebe.

### **D.7. Effekte auf Eukaryoten und *in-vivo*-Verwendung: Pharmakokinetik und Pharmakodynamik**

Es war ein Ziel dieser Arbeit, die Möglichkeit einer klinischen Anwendung von Salmycin zu analysieren und einzuschätzen. Aus diesem Grund wurde zunächst das Auftreten zytotoxischer Effekte durch Salmycin in Zellkulturen untersuchen. Der LDH-Assay erwies sich hierfür als effizientes Testverfahren mit ausgesprochen guter Reproduzierbarkeit (Legrand et al., 1992) Die beobachteten Auswirkungen von Salmycin auf Hep2-Zellen lassen auf keine signifikante Zytotoxizität der Substanz bei kurzzeitiger Einwirkung schließen. Dies ist relevant, da somit die Gefahr einer Schädigung von Gefäseepithel bei intravenöser Gabe unwahrscheinlich ist. Jedoch wurde bei längerer Inkubation eine leicht erhöhte Zellsterberate beobachtet, die nach einem Anstieg innerhalb der ersten 10 Stunden wieder abnahm. Im Rahmen der MIC-Bestimmung konnte nachgewiesen werden, dass Salmycin *in vitro* kontinuierlich abgebaut wird. Daher ist denkbar, dass der toxische Effekt durch Abbauprodukte des Salmycins hervorgerufen wird. Es ist jedoch davon auszugehen, dass in einem lebenden Organismus ein toxischer Effekt durch die hohe Verdünnung und metabolische Entgiftungsvorgänge nicht zu erwarten ist. Es ist möglich, dass Inhaltsstoffe des verwendeten Mediums oder Substanzen aus dem Zellstoffwechsel zum Abbau von Salmycin führten. Da es sich beim LDH-Assay um einen indirekten Nachweis handelt, ist abzuwägen, ob weiterführende Versuche mit direkten Methoden wie dem Flow-Zytometer stattfinden sollen. In den *in-vitro*-Vorversuchen wurde zudem ausgeschlossen, daß dass Salmycin nicht durch Bindung an Serumproteine in seiner Wirksamkeit beeinflusst wird.

## D.8. *In-vivo*-Aktivität

Tests in Zellkulturen besitzen stets den Nachteil, reale Verhältnisse nur teilweise nachbilden zu können. Um Aussagen über die Wirksamkeit von Salmycin gegen Infektionen machen zu können wurden Versuche mit Mäusen durchgeführt.

Aminoglykosidantibiotika weisen einige typische Eigenschaften auf. Vertreter dieser Klasse werden bei oraler Gabe nicht resorbiert und müssen daher parenteral verabreicht werden. Sie besitzen eine kurze Halbwertszeit von etwa zwei bis drei Stunden und werden hauptsächlich über die Niere ausgeschieden. Zudem passieren sie kaum die Zellmembran des Wirtsorganismus und sind deshalb nur schlecht gewebeängig (Tam et al., 1999). Darüber hinaus besitzt die Mehrzahl nur eine geringe therapeutische Breite und bedürfen einer sorgfältigen Dosierung. Viele Vertreter wie das bekannte Streptomycin weisen ausserdem nephrotoxische oder ototoxische Eigenschaften auf. Diese beruhen auf einer Schädigung der proximalen Tubuluszellen der Niere bzw. der Haarzellen im Innenohr (Kaloyanides, 1994). Der Einsatz von Aminoglykosiden ist deshalb zumeist auf die stationäre Therapie beschränkt. Eine gravierende Zytotoxizität von Salmycin wurde im LDH-Assay nicht festgestellt, so dass eine *in-vivo*-Versuchsreihe mit MRSA am Mausmodell gerechtfertigt war. Trotzdem wurden einige der hier aufgezählten Eigenschaften im Verlauf der Arbeit auch bei Salmycin festgestellt: geringe Halbwertszeit und enges Erregerspektrum. Im Mausmodell wurde für Salmycin A lediglich eine moderate Effektivität in der Reduktion der Keimzahl festgestellt. Die anfänglich verwendete Dosis von 2 mg/kg orientierte sich am homolog durchgeführten Infektionsmodell für Albomycin (1 mg/kg; Pramanik et al., 2007). Da kein relevanter Effekt nachzuweisen war, wurde die Konzentration von Salmycin gegenüber der verwendeten Albomycindosis um den Faktor 10 erhöht. Auch mit einer Dosis von 10 mg/kg erreichten die Ergebnisse nicht die Werte der Positivkontrolle, zeigten jedoch eine eindeutig nachweisbare Reduktion der Keimzahl.

Die Gründe für die moderate Effektivität von Salmycin in der *in-vivo*-Anwendung können vielfältig sein. Sie weisen nicht zwangsläufig auf eine Untauglichkeit von Salmycin A für eine klinische Anwendbarkeit hin, zeigen aber deutlich deren Schwächen. Da die Auszählung der Keimzahl erst 48 Stunden nach der letzten Salmycingabe erfolgte, ist zu hinterfragen, ob in diesem Zeitraum eine dezimierte Keimpopulation sich nicht erneut vermehrt haben könnte. Zudem geben die Daten

der *in-vivo*-Studie Hinweise auf eine nicht ausreichende Gewebegängigkeit. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass Keimherde in Organbereichen mit schlechter Durchblutung erneut ausstreuen. Bessere Resultate in der Anwendung von Salmycin sind denkbar, wenn das Antibiotikum mehrmalig und mit höherer Frequenz (etwa alle sechs oder 12 Stunden) verabreicht wird, wie es in der Praxis für Aminoglykoside normalerweise geschieht. Dadurch wird ein permanent hoher Serumspiegel gewährleistet und die Gefahr einer Resistenzbildung stark verringert (Kayser et al. 2005). Eine kombinierte Gabe mit einem gewebeängigen Antibiotikum würde eine effektive Therapie ebenfalls unterstützen.

Aminoglykoside erreichen bei parenteraler Gabe bereits nach 30 bis 90 min ihren maximalen Serumspiegel. Sie zeichnen sich zudem durch einen ausgeprägten postantibiotischen Effekt aus, was bedeutet, dass auch lange nach der Gabe eine bakterienhemmende Wirkung bestehen bleibt (Hatala et al., 1996; Siegenthaler et al., 1986). Die Untersuchungen im Mausmodell weisen darauf hin, dass Salmycin diesen Effekt nicht besitzt. Dies kann mit der geringen Stabilität und einer daraus resultierenden kurzen Serumhalbwertszeit der Substanz erklärt werden.

Bei der Erwägung weiterer unerwünschter Effekte, sollten auch sekundär eintretende Wirkungen in Betracht gezogen werden, die durch den raschen Zerfall von Salmycin auftreten könnten: So erwies sich Salmycin B im *in-vivo*-Versuch als untauglich, da es im physiologischen pH-Bereich (pH 7,4) nicht stabil ist. Da die Keimzahlen der Salmycin B-Gruppe die Negativkontrolle leicht überstiegen, muss angenommen werden, dass ein wachstumsfördernder Effekt durch die Abbauprodukte hervorgerufen wird. Diese sekundäre Wirkung ist durchaus erklärbar und bereits von anderen Substanzen bekannt.

Desferal<sup>®</sup> ist das eisenfreie Salz von Ferrioxamin und wird als Chelatbildner bereits erfolgreich gegen chronische Eisenüberladungskrankheiten (Hämochromatose) und akute Eisenintoxikationen eingesetzt (Porter, 2007). Es komplexiert freies Eisen im Serum und wird über die Nieren ausgeschieden. Nachteilig für die Patienten wirkt sich das eisenbeladene Desferal<sup>®</sup> jedoch durch eine Erhöhung der Empfänglichkeit für Yersiniosen (*Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*) und andere schwere Infektionskrankheiten aus, da die Substanz als Wachstoffsstoff für *Yersinia* wirkt (Lesic et al., 2002; Pallister et al., 2001). Aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit zwischen

Desferal® und Danoxamin kann ein identischer Effekt von hydrolysiertem Salmycin erwartet werden. Bereits im Verlauf der Untersuchungen des Wirkspektrums konnte bei Patientenisolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* eindeutig wachstumsfördernde Effekte beobachtet werden.

Die Untersuchung der Organe Milz, Leber und Nieren im Mausmodell zeigte, dass die höchsten Keimzahlen in der Niere gefunden wurden, während Milz und Leber nahezu keimfrei waren. Die Bevorzugung dieses Organs kann ein Resultat eines erhöhten Vorkommens an frei zugänglichem Eisen durch Abbauprodukte von Salmycin sein. Somit muss eine klinische Anwendung von Salmycin bei Infektionen mit Gram-negativen Keimen insgesamt als kritisch betrachtet werden. Eine interessante Alternative wäre eine epikutane Anwendung auf Wundinfektionen. Diese These sollte einer Prüfung unterzogen werden, denn der Haut-Säureschutzmantel mit einem pH-Wert um 5,5 könnte einen antibiotischen Effekt unterstützen. Hierbei wäre unter den Aspekten der Galenik zu beachten, dass eine gleichmässig hohe Antibiotikakonzentration erhalten bleibt um Resistenzen zu unterdrücken (Stricker, 2003). Denkbar wäre auch eine Anwendung in Kombination mit anderen Antibiotika.

### D.9. Wirkungsweise von Salmycin

Untersuchungen zum Wirkort waren nicht primär Bestandteil dieser Arbeit. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Aminoglykosidantibiotika wurde ein Target in der Proteinbiosynthese der Zelle postuliert. Daten hierzu liegen jedoch nicht vor. Von Danomycin konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es in der 30S-Untereinheit der Ribosomen bei der Translation den Einbau von Phenylalanin hemmt (Knüsel et al., 1969). Von Albomycin ist bekannt, dass zu seiner Aktivierung in *E.coli* und *S. typhimurium* die Spaltung durch Peptidase N nötig ist (Braun et al., 1983). Eine Hemmung der Seryl-tRNA-Synthetase durch Albomycin wurde im Rahmen eines Screeningprogramms von Stefanska et al. (2000) an Ratten nachgewiesen.

Auch für Salmycin wurde eine intrazelluläre Aktivierung vermutet (Braun, persönliche Kommunikation). Im Verlauf dieser Arbeit konnte keine Aktivität von bereits inkorporiertem Salmycin mehr beobachtet werden, so dass von modifizierenden Prozessen im Cytolasma ausgegangen werden kann, wie Miller (2000) vermutet.

### **D.10. Sideromycine – eine effektive Waffe gegen Superkeime?**

Das Prinzip der Sideromycine besteht in der Kopplung eines Eisen-Carriers mit einer antibiotisch aktiven Einheit. Aufgrund des für den Zellstoffwechsel immens wichtigen Eisens besitzen Bakterien für Siderophore spezifische Transportkomplexe. Das Antibiotikum wird dadurch wie ein trojanisches Pferd in die bakterielle Zelle geschleust. Inzwischen ist eine ganze Reihe von Sideromycinen bekannt. Während die Anzahl möglicher Siderophortypen begrenzt ist, gibt es grossen Variantenreichtum bei den antimikrobiellen Liganden (Spellberg et al., 2004; Diarra et al., 1996; Miller et al., 1991). Salmycin besitzt an dieser Stelle ein antibiotisches Aminodisaccharid während es sich bei Albomycin um ein mit Schwefel substituiertes Nukleosid handelt (Braun, 1999; Gause et al., 1955). Bereits daraus kann man schliessen, dass die eigentliche Raffinesse dieser Taktik die Darreichungsform des Antibiotikums ist. Die Kombination „Siderophor und Antibiotikum“ bringt einen starken Synergieeffekt mit sich: eine spezifische Barriere wird überwunden und die Substanz wird bis zum 1000-fachen der äusseren Konzentration in der Bakterienzelle akkumuliert (Curtis et al., 1988). Sideromycine stellen daher eine effektive Möglichkeit der Einschleusung antibiotisch aktiver Moleküle in prokaryotische Zellen dar. Säugerzellen hingegen scheinen keine für Sideromycine spezifischen Transportsysteme zu besitzen. Jedoch ist für Albomycin bekannt, dass es eine Wirkung auf eukaryotische t-RNA besitzt (Braun, persönliche Kommunikation) Der Einsatz von Sideromycinen in der Medizin brächte sicherlich Vorteile, wie etwa die Verringerung der einzusetzenden Konzentrationen und der damit verbundenen Nebenwirkungen oder der Optimierung der lokalen antibiotischen Therapie.

Sideromycine werden von einigen Streptomyceten synthetisiert. Jedoch stellen die ökologischen Refugien ihrer Produzenten wahrscheinlich hinsichtlich der Substanzeigenschaften andere Anforderungen als es ein medizinischer Einsatz verlangt. Eine Anwendung von Sideromycinen in der klinischen Praxis ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht denkbar, obwohl Albomycin über einige Jahre in der Sowjetunion eine Anwendung fand (Gause, 1955). Um dies zu ermöglichen ist es nötig, Produktionsverfahren, die eine chemische Modifikation der Substanzen in grossem Maßstab erlauben oder - idealerweise – die Identifikation und Manipulation

der Synthesecenter zur biotechnologischen Herstellung anwendbarer Sideromycine, zu entwickeln. Zudem sind medizinische Risiken auszuschliessen.

Anhand der in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass Salmycin trotz seiner *in-vitro* immens starken Wirkung gegen *S. aureus* Eigenschaften aufweist, die seine klinische Anwendung erheblich erschweren. Der Schwachpunkt von Salmycin liegt offenbar in der leicht hydrolysierbaren Esterbindung zwischen Siderophor und den antibiotisch wirksamen Aminoazuckern. Zudem ist Salmycin A im physiologischen pH-Bereich nur mässig stabil. Dies resultiert *in-vivo* in kurzen Plasmahalbwertszeiten. Eine Anwendung bei Infektionen mit Gram-negativen Keimen ist nahezu ausgeschlossen: Auch wenn die entsprechende Spezies ein Aufnahmesystem mit Salmycin-Spezifität besitzt, besteht das Risiko, dass das Sideromycin im periplasmatischen Raum abgebaut wird. Hier birgt Salmycin die zusätzliche Gefahr von Wachstumsförderung und Resistenzbildung durch das bei der Hydrolyse entstehende Danoxamin. Dagegen ist eine Anwendung von Salmycin bei Gram-positiven Kokken, insbesondere *S. aureus* zunächst denkbar. Weitere Untersuchungen, die sich mit der Entwicklung eines Therapieschemas – etwa für eine epikutane Anwendung oder zur Sanierung von MRSA-Trägern - befassen sind jedoch nötig, um Dosis, Verabreichungsintervall und eventuell Kombinationsantibiotika zu determinieren.

## E. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Antibiotikum Salmycin untersucht, welches zur Substanzklasse der Sideromycine zählt. Im Verlauf der Untersuchungen wurden die Fermentationsparameter für Salmycin untersucht. Verglichen wurden Syntheseverlauf und Salmycinausbeute bei Fermentation in Komplexmedium und definiertem Produktionsmedium, Ein Protokoll zur Salmycinaufreinigung im mittleren Produktionsmaßstab wurde erstellt.

Des Weiteren wurde das Wirkspektrum von Salmycin anhand relevanter Pathogene erfasst und die minimale Hemmkonzentration sensitiver Keime bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Salmycin ein sehr eng begrenztes Wirkspektrum besitzt und insbesondere Staphylokokken hochsensitiv gegen das Sideromycin sind.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Salmycin aufgrund seiner Strukturähnlichkeit über das Ferrioxamintransportsystem in die bakterielle Zelle geschleust wird. Ein Schwerpunkt der Arbeit bildete die Untersuchung des Aufnahmesystems von *Staphylococcus aureus*. Die Sequenzierung resistenter Keime ergab Punktmutationen im Transmembrankomplex. Das Lipobindeprotein FhuD2 wies sich als relevant für die Erkennung von Salmycin.

Auch der Fragestellung, weshalb die meisten Gram-negativen Bakterien keine Sensitivität zeigen wurde nachgegangen. Hierbei ergab sich, dass die äußere Membran eine wirksame Barriere darstellt und von Salmycin nur mittels eines spezifischen Transportproteins überwunden werden kann. Allerdings scheint noch ein zweiter Schutzmechanismus bei Gram-negativen Mikroorganismen eine Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass Enzyme des Cytoplasmas eine Inaktivierung des Antibiotikums bewirken.

Zuletzt wurde untersucht, inwieweit eine klinische Anwendung von Salmycin in Frage käme. Hierzu wurde die Zytotoxizität der Substanz über LDH-Assay geprüft und ein Maus-Infektionsmodell für *Staphylococcus aureus* entwickelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Salmycin bei physiologischem pH-Wert eine kurze Halbwertszeit besitzt und *in-vivo* nur geringe Wirksamkeit zeigt.

## F. Index

### I. Abkürzungen

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ÄM	Äussere Membran
ALB	Albomycin
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	deionisiert, destilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	BLAST für Nukleinsäuresequenzen
BLASTP	BLAST für Aminosäuresequenzen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bezgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CFU	colony forming unit
CI	Competitive Index
CLUSTALW	Command Line Multiple Sequence Alignment by Software Tool
CM	Cytoplasmamembran
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDDHA	Ethylene-diamine-Di-(o-Hydroxyphenylacetic acid)
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid
ErBr	Ethidiumbromid
FCH	Ferrichrom
Fhu	Ferric Hydroxamate Uptake
FOX	Ferrioxamin
Fur	Ferric Uptake Regulator
g+/g-	Gram-positiv/Gram-negativ
GAS	Gruppe A-Streptokokken
GBS	Gruppe B-Streptokokken
HA	Sporulationsmedium für Streptomyceten
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Iso-propyl-thio-Galactosidase
LB	Luria-Bertrani
LPS	Lipopolysaccharid
MEtOH	Methanol
MIC/MHK	minimale Hemmkonzentration
MO	Mikroorganismen

---

MOPS	Morpholino-Propane Sulphonic Acid
MS	Massenspektromie
MW	Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt
NB	Nutrient Broth
NBD	Nutrient Broth + Dipyridyl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	periplasmatisches Bindeprotein
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenyl-methyl-sufonyl-Fluoride
RBS	ribosomale Bindestelle
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAL	SAL
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tri-Acetic-EDTA
TB	Terrific Broth
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'-Tetramethylethylethylendiamine
TET	Tetracycline
THY	Todd-Hewitt Broth mit Hefeextrakt
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	transfer-RNA
TY	Tryptic Broth mit Hefeextrakt
U	Unit
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
VAN	Vancomycin
vgl.	Vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

**II. Nukleotide**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymidin

**III. Aminosäuren**

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

**IV. (Basis-) Einheiten**

A	Ampere	$\mu$	Mikro-
°C	Grad Celsius	m	milli-/Meter
cm	Zentimeter	M	Molar
Bq	Becquerel	min	Minute
F	Farad	mm	Millimeter
h	Stunde(n)	n	Nano-
g	Gramm	$\Omega$	Ohm
Da	Dalton	sec	Sekunde(n)
l	Liter	V	Volt
k	kilo-		

## G. Literaturverzeichnis

Alanis A. J. (2005): Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **36**: 697 – 705.

Atkins, P. W. und Beran, J. A (1998) in : Chemie – einfach alles. p. 34f., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Atlas, R. M. (1997) in: Principles of Microorganisms. 2nd ed., WCB Publishers, USA

Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F.-X., Leblond, P., Pernodet, J.-L. und Challis G. L. (2006): Multiple biosynthetic and uptake systems mediate Siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* **152**: 3355 – 3366.

Barrett C. T. und Barrett J. F. (2003): Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 621 – 626.

Bäumler, A. J. und Hantke, K. (1992): A Lipoprotein of *Yersinia enterocolitica* facilitates ferrioxamine uptake in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 1029 – 1035.

Bäumler, A. J. und Hantke, K. (1992): Ferrioxamine uptake in *Yersinia enterocolitica*: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol. Microbiol.* **6**: 1309 – 1321)

Baichoo, N. und Helmann, J. D. (2002): Recognition of DNA by Fur: Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J. Bacteriol.* **184**: 5826 – 5832.

Baquero, F. (1997): Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **39 Suppl A**: 1 – 6.

Benz R., Beckers F. und Zimmermann, U. (1979): Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. *J Membr Biol.* **48**: 181-204.

- Berner, I. und Winkelmann, G., (1990): Ferrioxamine transport mutants and the identification of the ferrioxamine receptor protein (FoxA) in *Erwinia herbicola* (E agglomerans). *Biol Met.* **2**: 197-202.
- Bickel, H., et al. (1960): Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A1 + A2, neuer Antibiotika der Sideromycingruppe. *Helv. Chim. ACTA* **43**: 2105 –18.
- Bickel, H., Mertens, P., Prelog, V., Seibl, J. und Walser, A. (1965): Constitution of Ferrimycin A1. *Antimicrobial Agents Chemother. (Bethesda)* **5**: 951 – 957.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**; **7**: 1513-23.
- Bödekker, N., Bahador, G., Gibbs, C., Mabery, E., Wolf, J., Xu, L. und Watson J. (2002): Charakterization of a novel antibacterial agent that inhibits bacterial translation. *RNA* **8**: 1120 – 1128.
- Boggs, A.F. und Miller, G.H. (2004): Antibacterial drug discovery: is small pharma the solution? *Clin. Microbiol. Infect.* **10 Suppl 4**: 32 – 36.
- Borths, E. L., Poolman, B., Hvorup, R. N., Locher, K. P. und Rees, D.C. (2005): In Vitro Functional Characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC Transporter for Vitamin B12 Uptake. *Biochemistry* **44**: 16301 – 16309.
- Braun, V., Günthner, K., Hantke, K. und Zimmermann, L. (1983): Intracellular Activation of Albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **156**: 308 – 315.
- Braun, V., Gunter, K. und Hantke, K. (1991): Transport of iron across the outer membrane. *Biol. Met.* **4**: 14 – 22.
- Braun, V. (1995): Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 295 – 307.

Braun V. (1999): Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug Resist. Update* **2**: 363 - 369.

Braun, V. (2001): Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 67 – 79.

Braun, V. und Braun, M. (2002): Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr. Opin Microbiol.* **5**: 194 – 201

Braun, V. und Braun, M. (2002): Iron transport and signaling in Escherichia coli. *FEBS Letters*, **529**: 78 - 85.

Braun, V., Mahren, S. und Sauter, A. (2006): Gene regulation by transmembrane signalling. *Biometals* **19**: 103 -110.

Braun, V. und Hantke, K. (2007): Acquisition of Iron by Bacteria. In: Nies. D.H und Silver S.: Molekular Microbiology of Heavy Metals. Springer Verlag, Heidelberg.

Budde, A. D. und Leong, S. A. (1989): Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* **108**: 125 – 133.

Budzikiewicz, H. (2001): Siderophore-antibiotic conjugates used as Trojan horse against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 73 – 82.

Bunet, R., Brock, A., Rexer, H. U., Takano, E. (2006): Identification of genes involved in siderophore transport in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett.* **262**: 57-64.

Buzetti, F., Gäumann, E., Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Neipp, L., Prelog, V. und Zähler, H. (1963): Metabolisms of Microorganisms. 41. MANUMYCIN. [Article in German] *Pharm Acta Helv.*, **38**: 871-4.

Carlyon, J. A., Ryan, D., Archer, K. und Fikrig, E. (2005): Effects of *Anaplasma phagocytophilum* on host cell ferritin mRNA and protein levels. *Infect. Immun.* **73**: 7629 - 36.

Challis, G. L. und Naismith, J. H. (2004): Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 748 – 756.

Challis, G. L. (2005): A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of non-ribosomal peptide synthetases. *Chembiochem.* **6**: 601 – 611.

Chambers, C. E, Sokol, P. A. (1994): Comparison of siderophore production and utilization in pathogenic and environmental isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 32-9

Crosa, J. H. und Walsh, C. T. (2002): Genetics and assembly line enzymology of Siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 223 – 249.

Curtis, N. A., Eisenstadt R. L., East, S. J., Cornford, R. J., Walker, L. A. und White, A. J. (1988): Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**: 1879–1886.

Dale, S. E., Doherty-Kirby, A, Lajoie, G. und Heinrichs, D.E. (2006): Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect Immun.* **72**: 29 – 37.

Dauga, C. (2002): Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**: 531 – 547.

- Deiss, K., Hantke, K. und Winkelmann, G. (1998): Molecular recognition of siderophores: A study with cloned ferrioxamine receptors (FoxA) from *Erwinia herbicola* and *Yersinia enterocolitica*. *Biometals*. **11**: 131 – 137.
- Dhungana, S., White, P. S. und Crumbliss, A. L. (2001): Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**: 810 – 818.
- Diarra, M. S., Lavoie, M. C., Jacques, M., Darwish, I., Dolence, E. K., Dolence, J. A., Ghosh, A., Ghosh, M., Miller, M. J. und Malouin, F. (1996): Species Selectivity of New Siderophore-Drug Conjugates That Use Specific Iron Uptake for Entry into Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* **40**: 2610 – 2617.
- Dörner, K. (2006) in: Klinische Chemie und Hämatologie. Thieme – Flexibles Taschenbuch, Thieme Verlag, Stuttgart
- Emery, T. F. (1966): Initial steps in the biosynthesis of ferrichrome. Incorporation of delta-N-hydroxyornithine and delta-N-acetyl-delta-N-hydroxyornithine. *Biochemistry* **5**: 3694 – 3701.
- Emery, T. (1971): Role of ferrichrome as a ferric ionophore in *Ustilago sphaerogena*. *Biochemistry* **10**: 1483 – 1488.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368 – 376.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 83 - 791.
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. und Welte, W. (1998): Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215 – 2220.

- Ferguson, A. D., Braun, V., Fiedler, H.-P., Coulton, J. W., Diederichs, K. und Welte W. (2000): Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transport FhuA. *Protein Sci.* **9**: 707 – 716.
- Fiedler, H.-P. (1977): Isolierung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten mit Hilfe von Adsorberharzen. *Chemische Rundschau* **30**: 2 – 3.
- Fiedler, H.-P. und Sauerbier J. (1978): Metabolic products of Microorganisms, 165th Communication – Isolation and Quantitative Determination of Siderochromes. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 51 – 57.
- Fiedler, H.-P., Walz, F., Dohle, H. und Zähler H. (1985): Albomycin: Studies in fermentation, isolation and quantitative determination. *Appl. Microbiol. Biotech.* 341 – 347.
- Fiedler, H.-P., Krastel, P., Müller, J. und Zeeck, A. (2001): Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 147 – 151.
- Flores, F. J. und Martín, J. F. (2004): Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *Biochem J.* **380**: 497 – 503.
- Forman, S., Nagiec, M. J., Abney, J., Perry, R. D. und Fetherston, J. D. (2007): Analysis of the aerobactin and ferric hydroxamate uptake systems of *Yersinia pestis*. *Microbiology* **153**: 2332 – 2341.
- Fuangthong, M. und Helmann, J.D. (2003): Recognition of DNA by three Ferric Uptake Regulator (Fur) Homologs in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6348 – 6357.
- Gause, G. F. (1955): Recent studies on Albomycin, a new antibiotic. *Br. Med. J.*: p. 1177 – 1179.

Gerlach, E. H. (1974): Microdilution I: a comparative study, p. 63 – 74. In A. Balows (ed.), Current techniques for antibiotic susceptibility testing. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill.

Goldberg, A. (1972): Correlation Between rates of Degradation of Bacterial Proteins In Vitro and Their Sensitivity to Proteases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 2640 – 2644.

Grass G. (2006): Iron transport in Escherichia coli: all has not been said and done. *Biometals* **19**: 159 - 72.

Günter-Seeboth, K. und Schupp, T. (1995): Cloning and sequence analysis of the Corynebacterium diptheriae DtxR homologue from Streptomyces lividans and Streptomyces pilosus encoding a putative iron repressor protein. *Gene* **166**: 117 – 119.

Hacker, J. (2000): Unspezifische Pathogenitätsfaktoren. In: Molekulare Infektionsbiologie. Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen. ( ed.:J. Hacker und J. Heeseman), pp. 88 – 89, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin.

Hantke, K. (2001): Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 172 – 177.

Hartmann A., Fiedler, H.P. und Braun, V. (1979): Uptake and Conversion of the antibiotic Albomycin by E. coli K-12. *Eur. J. Biochem.* **99**: 517 – 524.

Hatala R., Dinh T., Cook D.J. (1996): Once-Daily Aminoglycoside Dosing in Immunocompetent Adults: A Meta-Analysis. *Ann. Intern. Med.* **124**: 717-725.

He, J., Eckert, R., Pharm, T., Simanian, M. D., Hu, C., Yarbrough, D. K., Qi, F., Anderson, M. H. und Shi, W. (2007): Novel synthetic antimicrobial peptides against Streptococcus mutans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1351 – 8.

- Howard, J. B. und Rees, D. C. (2006): Nitrogen Fixation Special Feature - How many metals does it take to fix N<sub>2</sub>? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **103**: 17088–17093.
- Hu, C.-J., Bai, C., Zheng, X.-D., Wang, Y.-M. und Wang, Y. (2002): Characterization and Functional Analysis of the Siderophore-Iron Transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **277**: 30598 – 30605.
- Huber, P. et al. (1986): Danoxamin, der eisenbindende Teil des Sideromycin-Antibiotikums Danomycin. *Helv. Chim. ACTA* **69**: 236 – 245.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J.C., Berks, B. C. und Palmer, T.(2004): Novel Phenotypes of *Escherichia coli* tat Mutants Revealed by Global Gene Expression and Phenotypic Analysis. *J. Biol. Chem.* **279**: 47543 – 47554.
- Jacoby, G. A. (1996): Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu. Rev. Med.* **47**:169 – 79.
- Jin, B., Newton, S.M., Shao, Y., Jiang, X., Charbit, A. und Klebba, P.E. (2006): Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **59**: 1185 - 98.
- Jung, W. H., Sham, A., White, R. und Kronstadt, J. A. (2006): Iron Regulation of the Major Virulence Factors in the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* **4**: 2282 – 2295.
- Justino, M. C., Almeida, C. C., Teixeira, M. und Saraiva, L. M. (2007): *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J Biol Chem.* **282**: 10352 – 9.
- Kaloyanides, G.J. (1994): Antibiotic-Related Nephrotoxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9 (Suppl4)**: 130-134.

Katona, L. I., Tokarz, R., Kuhlow, C. J., Benach, J. und Benach, J. L. (2004): The Fur homologue in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**: 6443 – 6456.

Kayser, F. H., Böttger, E. C., Zinkernagel, R. M. (2005) in: Medizinische Mikrobiologie. Verstehe – Lernen – Nachschlagen. *Thieme – Flexible Taschenbücher*, Thieme Verlag, Stuttgart

Killmann, H. und Braun, V. (1992): An aspartate deletion mutatuin defines a binding site of the multifunctional FhuA outer membrane receptor of *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 3479 – 3486.

Kingsley, R. A., Reissbrodt, R., Rabsch, W., Ketley, J. M., Tsolis, R. M., Everest, P., Dougan, G., Bäumlner, A. J., Roberts, M. und Williams, P. H. (1999): Ferrioxamine-Mediated Iron(III) Utilization by *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol* **65**: 1610-1618:

Köster, W. und Böhm, B. (1992): Point mutations in two conserved glycine residues within the integral membrane protein FhuB affect Iron(III) hydroxamate transport. *Mol. Gen. Genet.* **232**: 399 – 407.

Kornreich-Leshem, H., Ziv, C., Gumiena-Kontecka, E., Arad-Yellin, R., Chen, Y., Elhabiri, M., Albrecht-Gary, A.-M., Hadar, Y. und Shanzer, A. (2005): Ferrioxamine B analogues: Targeting the FoxA Uptake System in Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 1137 – 1145.

Kraus, D. und Peschel, A. (2007): Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**: p. 231-50. (Review)

Kunkle, C.A. und Schmitt, M.P. (2005): Analysis of a DtxR-Regulated iron Transport and Siderophore Biosynthesis Gene Cluster in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **187**: 422 – 433.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **Bd. 227**: 680 – 685.

- Lan, C.-Y., Rodarte, G., Murillo, L.A., Jones, T., Davis, R.W., Dungan, J., Newport, G. und Agabian, N. (2004): Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **53**: 1451 – 1469.
- Legrand, C., Bour, J. M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., und Duval, D. (1992): Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected] *J Biotechnol.* , **25**: 231-43. Erratum in: *J Biotechnol* 1993 Nov; **31**: 234.
- Lesic, B., Foulon, F., und Carniel, E. (2002): Comparison of the Effects of Deferiprone versus Deferoxamine on Growth and Virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 1741–1745.
- Lisiecki, P. und Mickuki, J. (2006): Acquisition of iron by enterococci: some properties and role of assimilating ferric iron reductases. *Pol. J. Microbiol.* **55**: 271 – 277.
- Locher, K. P., Lee, A. T. und Rees, D.C. (2002): The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **10**, **296**: 1038 - 40.
- Lugtenberg, B., Meiers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alphen, L. (1975): Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Lett.* **15**; **58**: 254-8.
- Mademidis, A. und Köster, W. (1998): Transport activity of FhuA, FhuC, FhuD, and FhuB derivatives in a system free of polar effects, and stoichiometry of components involved in ferrichrome uptake. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 156 - 65.
- Madigan, M. T. und Martinko, J. M.(2005) in: Brock – Biology of Microorganisms. 11th Intl. ed., Pearson Education Inc., NY

- Maresso, A.W. und Schneewind, O. (2006): Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **19**: 193 – 203.
- Matzanke, B. F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A. X. und Hantke, K. (2004): FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* **43**: 1386 – 92.
- McHenney, M. A., Hosted, T. J., Dehoff, B. S., Rosteck, P. R. und Baltz, R. H. (1998): Molecular Cloning und Physical Mapping of the Daptomycin Gene Cluster from *Streptomyces roseosporus*. *J. Bacteriol* **180**: 143 – 151.
- McQuigge, M. (2001): Diseases: News and Emerging. *Can. J. CME*, Nov. 2001, pp. 239 – 251.
- Meiwes, J., Fiedler, H.-P., Zähler, H., Konetschny-Rapp, S. und Jung, G. (1990): Production of desferrioxamine E and new analogues by directed fermentation and feeding fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 505 – 510.
- Michel, M. und Gutmann, L. (1997): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *The Lancet* **349**: 1901 – 1906.
- Miller, M. J., McKee, J. A., Minnick, A. A und Dolence, E. K. (1991): The design, synthesis and study of Siderophore-antibiotic conjugates. Siderophore mediated drug transport. *Biol. Met.* **4**: 62 – 69.
- Modun, B., Evans, R. W., Joannou, C. L. und Williams, P. (1998): Receptor-Mediated Recognition and Uptake of Iron from Human Transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**: 3591 - 3596.
- Moore, C. M. und Helmann, J. D. (2005): Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 188 – 95.
- Müller, K. (1997): FhuF, ein neuartiges, eisenreguliertes Eisen-Schwefel-Protein von *E.coli*. *Doktorarbeit*, Universität Tübingen

Mullis, K. B. und Faloona, F. A (1987): Specific synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed Chain Reaction. *Methol. Enzymol.* **155**: 335 – 350.

Neilands, J. B. (1976): Siderophores: diverse roles in microbial and human physiology. *Ciba Found.Symp.*: 107 – 124

Neilands, J. B. (1995): Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723 – 26726.

Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A. und Braun, V. (2005): ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **187**: 8300 - 11.

Oleykowski, C. A., Bronson-Mullins, C. R., Goodwin, A. K. und Yeung, A .T. (1998): Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic. Acid. Res.* **26**: 4597 – 4602.

Pallister, C., Rotstein, O. D. (2001): *Yersinia enterocolitica* as a cause of intra-abdominal abscess: the role of iron. *Can J Surg* , **44**: 135-6.

Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Bélanger, S. D., Martel, E. A., Boudreau D. K., Picard, F. J., Ouellette, M., Roy, P. H. und Bergeron, M. G. (2005): Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase  $\beta$ -subunit. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **55**: 2013 - 2025.

Peirú, S., Menzela, H. G., Rodríguez, E., Carney, J. und Gramajo, H. (2005): Production of the Potent Antibacteria Ployketide Erythromycin C in *Eschericia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2539 – 2547.

Porter, J. B. (2007): Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. *Am J Hematol.* 2007 Oct 29; [Epub ahead of print]

Postle, K. (2007): TonB System, In Vivo Assays and Characterization. *Methods Enzymol.* **422**: 245 - 69.

Pramanik, A. (2006): Activity spectrum, in vivo efficacy of albomycin and its use in characterization of hydroxamate iron transport in *Streptococcus pneumoniae*. *Doktorarbeit*. Universität Tübingen.

Rabsch, W. und Winkelmann, G. (1991): The specificity of bacterial Siderophore receptors probed by bioassays. *Biol. Metals* **4**: 244 – 250.

Rammelkamp, C. H. und Keefer, C. S. (1943): Penicillin – its antibacterial effect in whole blood and serum for the hemolytic streptococcus and staphylococcus aureus. *J. Clin. Invest.* **22**: 649 – 57.

Redenbach, M., Scheel, J. und Schmitt, U. (2000): Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 227 – 235.

Redenbach, M. (2002): Warum haben einige Bakterien lineare Chromosomen und Plasmide? *In: Biospektrum* 2/2002, pp. 158 – 163.

Reissbrodt, R., Rabsch, W., Chapeaurouge A., Jung, G. und Winkelmann, G. (1990): Isolation and Identification of ferrioxamine G and E in *Hafnia alvei*. *Biol. Metals*, **3**: 54 - 60.

Rohrbach, M. R., Braun V. und Köster, W. (1995): Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* **177**: 7186 - 93.

Rohrbach, M. (1995): In vivo und in vitro Charakterisierung des Eisen(III)-Hydroxamat Bindeproteins FhuD. *Dissertation*, Zeeb-Druck, Tübingen

Roosenberg J. M. und Miller, M. J. (2000): Total synthesis of the siderophore danoxamine. *J. Org. Chem.* **65**: 4833 - 8.

Rosenblatt, J. E., Murray, P. R., Sonnenwirth, A. C. und Joyce, J. L (1979): Comparison of Anaerobic Susceptibility Results Obtained by Different Methods. *Antimicrob Agents Chemother.* **15**: 351–355.

Sackmann, W., Reusser P., Neipp, L., Kradolfer, F. und Gross, F. (1962): Ferrimycin A, a new iron-containing antibiotic. *Antibiot. Chemother.* **12**: 745 – 758.

Saiki, R. K., Scharf S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350 – 1354.

Saitou, N. und Nei, M. (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406 - 425.

Saiki, R.K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487 - 491.

Sanger, F., Nicklein, S und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 – 5467.

Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. und Palmer, T. (1999): Sec-independent Protein Translocation in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **274**: 36073 – 35082.

Schneider, R. und Hantke, K. (1993): Iron-hydroxamate uptake systems in Bacillus subtilis: identification of a lipoprotein as a part of a binding protein-dependent transport system. *Mol. Microbiol.* **8**: 111 - 121.

- Sebulsky, M. T., Hohnstein, D., Hunter, M.D. und Heinrichs, D.E. (2000): Identification and Characterization of a Membrane Permease Involved in Iron-Hydroxamate Transport in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**: 4394 – 4400.
- Sebulsky, M. T., Shilton, B. H., Speziali, C.D. und Heinrichs, D.E. (2003): The Role of FhuD2 in Iron (III)-Hydroxamate Transport in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **278**: 49890 – 49900.
- Sebulsky, M. T., Speziali, C. D., Shilton, B. H., Edgell, D. R. und Heinrichs, D. E. (2004): FhuD1, a ferric Hydroxamate-binding Lipoprotein in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**: 53152 – 53159.
- Shultis, D. D., Purdy, M. D., Banchs, C. N. und Wiener, M. C. (2006): Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* **312**: 1396 - 9.
- Siegenthaler, W. E., Bonetti, A., Lughy, A. (1986): Aminoglycoside Antibiotics in Infectious Disease: an Overview. *Am. J. Med.* **80 (Suppl 6B)**: 2-14.
- Silverman, J. A., Perlmutter, N. G. und Shapiro, H. M. (2003): Correlation of Daptomycin bactericidal Activity and Membrane Depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* **47**: 2538 – 2544.
- Simor, A. E. (2001): Containing methicillin-resistant *S aureus* - Surveillance, control, and treatment methods. *POSTGRADUATE MEDICINE.* **110**.
- Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K. L. und Schneewind, O. (2004): Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* **305**: 1626 - 1628.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G.T. , Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M. , Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150(1)**: 76-85.  
Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May **15;163(1)**: 279.

Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. und Edwards, J.E. (2004); Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* **38**: 1279 – 1286.

Stefanska, A. L, Fulston, M., Houge-Frydrych, C. S, Jones, J. J und Warr, S. R. (2000): A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species. *J Antibiot.*, **53**: 1346-53.

Stricker, H. (2003) in: Arzneiformen-Entwicklung. Springer-Verlag, Berlin.

Su, Z. und Honek , J. F. (2007): Emerging bacterial enzyme targets. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **8**: 140 – 9.

Tam VH., Preston S.L., Briceland L.L. ( 1999): Once-daily aminoglycosides in the treatment of gram-positive endocarditis. *Ann. Pharmacother.* **33**: 600-606.

Tangen, K. L., Jung, W. H., Sham A. P., Lian, T. und Kronstad, J. W. (2007): The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **153**: 29 – 41.

Towbin, H. et al. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **Bd. 76**: 4350 – 4354.

Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L. und Fang, F. C. (2007): The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol. Microbiol.*, **63**: 1495 - 507.

Vértesy, L., Aretz, W., Fehlhaber, H.-W. und Kogler, H. (1995): Salmycin A – D, Antibiotika aus *Streptomyces violaceus* DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur. *Helv. Chim. ACTA* **78**: 46 – 60.

Vértesy, L., et al. (1995): Salmycins, a process for their preparation and their use as a pharmaceutical. *United States Patent* No. 5,475,094

Walz, F. (1982): Optimierung der Albomycinfermentation. *Diplomarbeit* (739), Universität Tübingen.

Yamada, S. und Kawaguchi, H. (1964): Pharmacological Studies On Danomycin, a new Antibiotic. *J. Antibiot.* (Tokyo) **17**: 48 – 56.

Yang, B., Wen, X., Kodali, N. S., Oleykowski, C. A., Miller, C. G., Kulinski, J., Besack, D., Yeung, J. A., Kowalski, D. und Yeung, A. T. (2000): Purification, cloning, and characterization of CEL I nuclease. *Biochemistry* **39**: 3533 – 3541.

Yun, C.-W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein., D., Kaplan, J. und Philpott C. C. (2000): Desferrioxamine-mediated Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 10709 – 10715.

Zähner, A. (1977): Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. *Angew. Chem.* **89**: 696 – 703.

# H. Lebenslauf

Thomas Gwinner

geboren am 29.06.1977

in Gaildorf

1996 Abitur am Wirtschaftsgymnasium Schwäbisch Hall

2003 Diplom in Biologie, Universität Tübingen

2007 Sales Manager Microbiology, SIRS-Lab GmbH, Jena

2008 Promotion in Mikrobiologie, Universität Tübingen