

## Untersuchung des Einflusses von antimikrobiellen Fluorchinolonen auf die Human DNA-Topoisomerase II $\alpha$ und II $\beta$

Cole A. Fief,<sup>†</sup>Kristine G. Hoang,<sup>†</sup>Stephen D. Phipps,<sup>†</sup>Jessica L. Wallace,<sup>‡</sup>§und Joseph E. Dewese\*,<sup>†</sup>,||,<sup>†</sup>Department der Pharmazeutischen Wissenschaften and<sup>‡</sup>Department der Pharmazeutischen Praxis, Lipscomb University College of Pharmacy and Health Sciences, One University Park Drive, Nashville, Tennessee 37204-3951, Vereinigte Staaten  
Veteranenangelegenheiten Tennessee Valley Healthcare System, 1310 24th, Avenue South, Nashville, Tennessee 37232, Vereinigte States||Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, 2215 Garland Avenue, Nashville, Tennessee 37232-0146,Vereinigte Staaten

**ABSTRACT:** Fluorchinolone sind eine Klasse von weithin verschriebenen Antibiotika mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen grampositive, gramnegative und someatypische Mikroben. Leider sind diese Medikamente mit bedeutenden unerwünschten Ereignissen wie Neuropathie, Tendinopathie, Herzrhythmusstörungen und Nebenwirkungen auf die psychische Gesundheit verbunden. **Der Mechanismus, durch den Fluorchinolone viele dieser Toxizitäten hervorrufen, ist unbekannt.** Der antibakterielle Wirkungsmechanismus beinhaltet eine Störung des katalytischen Mechanismus von Typ-II-Topoisomerase-Bakterien, nämlich der Topoisomerase IV und der DNA-Gyrase. Fluorchinolone hemmen die Fähigkeit der Enzyme, gespaltene DNA zu ligieren und führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA. Daher besteht ein Interesse daran zu untersuchen, ob die menschliche Topoisomerase II an der Vermittlung der mit Chinolonen assoziierten unerwünschten Ereignisse beteiligt ist. Frühere Studien zeigen ein gewisses Ansprechen der humanen Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  bei hohen Ciprofloxacin-Konzentrationen. Es ist jedoch nicht klar, ob die in diesen Studien verwendete Ciprofloxacin-Konzentration den Konzentrationen entspricht, die routinemässig bei Patienten erreicht werden könnten. In dieser Studie sollten daher drei klinisch relevante Fluorchinolone zusammen mit zwei älteren Wirkstoffen untersucht werden, um festzustellen, ob diese Verbindungen eine Aktivität gegen die Topoisomerase aufweisen II $\alpha$  und II $\beta$  hat Medikamentenkonzentrationen, die den typischen Plasmawerten von Patienten näher kommen. Auf der Grundlage unserer Erkenntnisse war keines der untersuchten Chinolone in der Lage, die DNA-Spaltung durch eines der beiden menschlichen Enzyme zu vergiften. **Ciprofloxacin, Desethylen-Ciprofloxacin und das kürzlich vom Markt genommene Gemifloxacin waren in der Lage, die Topoisomerase-II-vermittelte DNA-Relaxation bei Konzentrationen von 200-300 $\mu$ M zu hemmen.** Auf der Grundlage dieser Daten schlagen wir vor, dass die menschliche Topoisomerase II wahrscheinlich nicht die Hauptursache für diese unerwünschten Ereignisse sein wird und dass zusätzliche Ziele

identifiziert werden müssen, um die Mechanismen zu klären, die den Chinolon-Toxizitäten zugrunde liegen.

**Einleitung:** Fluorchinolone sind eine weit verbreitete Klasse antimikrobieller Mittel, die erstmals in den 1960er Jahren in die klinische Praxis eingeführt wurden. <sup>1</sup> Nalidixinsäure, die zufällig als Verunreinigung in der Synthese des Chloroquin zur Malariabekämpfung isoliert wurde, war die erste Chinolonverbindung und zeigte bakterizide Wirkung gegen gramnegative Bakterien. <sup>1,2</sup> Obwohl sein Wirkmechanismus damals noch nicht klar definiert war, war seine klinische Anwendung geeignet, wenn auch beschränkt auf die Behandlung von Harnwegsinfektionen (Harnwegsinfektionen). <sup>2,3</sup> Nachfolgende Entwicklungen ergaben weitere verwandte Verbindungen, die fluoriert wurden und einen geringeren Resistenzgrad als Nalidixinsäure zeigten. Diese frühen Fluorchinolone wiesen eine begrenzte systemische Bioverfügbarkeit, folglich niedrige systemische Konzentrationen und eine mehrfache Tagesdosierung auf. <sup>1</sup> Die klinische Anwendung dieser Wirkstoffe blieb somit relativ auf Infektionen des Urogenitaltrakts beschränkt. <sup>4,5</sup> Strukturelle Modifikationen des Fluorchinolon-Rückgrats vermehrten sich weiterhin, was zu Verbindungen führte, die pharmakokinetische Verbesserungen (z.B. einmal tägliche Dosierung) zusammen mit einem deutlich erweiterten Spektrum an antimikrobieller Aktivität aufwiesen, das jetzt neben gramnegativen Organismen auch grampositive, atypische und, für einige Chinolone, anaerobe Organismen umfasst. <sup>1,2,4,5</sup> Aus einer Wirkstoffklasse, die ursprünglich mit einer engen, auf die Behandlung von Harnwegsinfektionen beschränkten klinischen Indikation entstanden ist, werden die Fluorchinolone heute routinemäßig bei der Behandlung zahlreicher Infektionen eingesetzt, darunter Infektionen der Atemwege, des Urogenitaltrakts, des Magen-Darm-Trakts, der Haut und der Weichteile sowie Knocheninfektionen. <sup>2</sup> Fluorchinolone stellen eine der am häufigsten verschriebenen Antibiotikaklassen dar, mit ca. 30 Millionen Verschreibungen im Jahr 2016. <sup>6</sup> Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin gehören zu den am häufigsten verschriebenen Fluorchinolonen. <sup>6</sup>

Erhalten: 6. Dezember 2018

Angenommen: 11. Februar 2019

Veröffentlicht: 22. Februar 2019

Die Entwicklung und Ausweitung der Fluorchinolonklasse sowohl in der Anzahl der Wirkstoffe als auch in ihrer therapeutischen Anwendung wurde von klinischem Enthusiasmus begleitet, jedoch wurde dieser berechnete Optimismus durch eine Vorgeschichte etwas gedämpft, in der eine bedeutende Anzahl von Offfluorchinolon-Wirkstoffen wegen erheblicher und manchmal tödlicher Toxizität vom Markt genommen wurde. <sup>3,5</sup> In den letzten zehn Jahren hat die US Food and Drug Administration (FDA) zahlreiche Sicherheitswarnungen zu schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen der derzeit erhältlichen systemischen Fluorchinolone herausgegeben, in denen auf das Risiko von Sehnenentzündungen, Sehnenrupturen, Herzrhythmusstörungen und Auswirkungen auf

das zentrale Nervensystem einschließlich Anfällen und peripherer Neuropathie hingewiesen wird.<sup>7</sup> Das Risiko einer peripheren Neuropathie wird seit 2004 in der Packungsbeilage der Fluorchinolone angegeben. Im August 2013 wurden jedoch aufgrund einer Überprüfung durch die FDA, bei der das Risiko dieser unerwünschten Wirkung als schnell auftretend identifiziert wurde, Änderungen an der Kennzeichnung vorgenommen, um diese Warnung zu verstärken und besser zu charakterisieren.<sup>8</sup> Zu den im FDA-Bericht beschriebenen Symptomen der peripheren Neuropathie gehören "Schmerzen, Brennen, Kribbeln, Taubheit, Schwäche oder eine Veränderung des Empfindens bei leichter Berührung, Schmerzen oder Temperatur oder des Körperpositionssinns".<sup>8</sup> In einer fallkontrollierten Studie an 45-80-jährigen Männern von 2001 bis 2011 bestätigten Etminan et al., dass Fluorchinolone-Anwender ein erhöhtes Risiko hatten, eine periphere Neuropathie zu entwickeln.<sup>9</sup> Bei einer Stratifizierung durch den Fluorchinolone-Typ war das Risiko ähnlich. Fluorchinolone sind dafür bekannt, dass sie die Funktion bakterieller Typ-II-Topoisomerasen stören, insbesondere die Topoisomerase IV in grampositiven und die DNA-Gyrase in gramnegativen Bakterien, obwohl es Ausnahmen von dieser Verallgemeinerung gibt.<sup>10,11</sup> Topoisomerasen sind für die Regulierung der DNA-Topologie verantwortlich und kommen in allen drei Lebensbereichen vor.<sup>12</sup> Typ-II-Topoisomerasen lindern die positive Supercoiling, die während der Transkription und Replikation auftritt, und dekatenieren die Schwesterchromatiden während der Replikationstermination durch Erzeugung eines vorübergehenden Doppelstrangbruchs der DNA.<sup>13</sup> Diese Enzyme durchlaufen die intakte DNA-Helix durch den temporären Doppelstrangbruch (DSB), bevor sie die DNA wieder zusammenbinden.<sup>10,14,15</sup> Die Unterbrechung dieses Mechanismus wurde sowohl in antimikrobiellen als auch in Krebstherapeutika verwendet. Humansencode zwei Isoformen der Topoisomerase II: Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ , die bekannte Angriffspunkte für Krebsmedikamente sind.<sup>13,14,16</sup> Beide Isoformen finden sich im Zellkern und im Mitochondrium.<sup>17-19</sup> Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion wurden in Modellsystemen in Gegenwart von Offluorchinolonen nachgewiesen und als mögliche Ursachen für mehrere der beobachteten unerwünschten Ereignisse bei Patienten angeboten.<sup>20-23</sup> Autoren einer neueren Studie vermuten, dass, da bakterielle Typ-II-Topoisomerasen (ähnlich der Topoisomerase IV) von Fluorchinolonen angegriffen werden, die mitochondriale Dysfunktion, die in einige der beobachteten unerwünschten Ereignisse verwickelt ist, durch Interaktionen zwischen Fluorchinolonen und menschlicher Topoisomerase erklärt werden könnte II $\alpha$  oder II $\beta$  in Mitochondrien.<sup>19</sup> Zu diesem Zweck legten die Autoren unter 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Beweise dafür vor, dass Ciprofloxacin die mtDNA-Replikation beeinträchtigen kann.<sup>19</sup> Die Autoren weisen auch darauf hin, dass die Auswirkungen auf die mitochondriale DNA-Replikation wahrscheinlich durch die Bytopoisomerase vermittelt werden II $\beta$ .

Ogleich die obige Studie eine interessante Hypothese liefert, war das einzige Fluorchinolone, für das Daten vorgelegt wurden ciprofloxacin. Darüber hinaus wurden nur sehr wenige Daten vorgelegt, die belegen, ob diese Verbindung eine direkte Aktivität auf die menschliche Topoisomerase hat II $\alpha$  oder II $\beta$ . Andere Studien der letzten Jahre konzentrierten sich auf die humane Topoisomerase II $\alpha$  und auf entweder ciprofloxacin oder Moxifloxacin.<sup>24</sup> Deshalb haben wir die Aktivität einer Reihe von Fluorchinolonen in klinisch relevanten Konzentrationen gegen beide humane Topoisomerasen II $\alpha$  und II $\beta$ . Mit Hilfe einer Reihe enzymologischer Assays zeigen wir, dass Fluorchinolone eine variable Wirkung gegen die Humantopoisomerase aufweisen II $\alpha$  und II $\beta$ . Zum Beispiel schien keine der

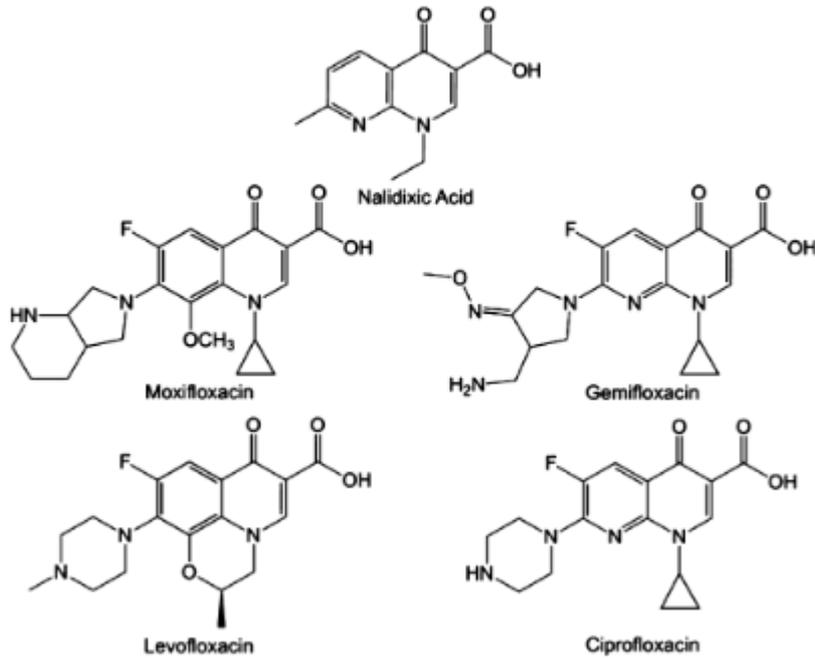
Verbindungen die DNA-Spaltung mit humaner Topoisomerase signifikant zu erhöhen II $\alpha$  oder II $\beta$ , was darauf hindeutet, dass diese Verbindungen keine Antikrebsmittel wie Etoposid gegen die menschlichen Enzyme imitieren. Bei höheren Arzneimittelkonzentrationen zeigen Somefluorchinolone, einschließlich Gemifloxacin und Ciprofloxacin, jedoch eine hemmende Aktivität gegen die durch die menschliche Topoisomerase II vermittelte DNA-Relaxation. Der Ametabolit von Ciprofloxacin wirkt sich auch auf die Topoisomerase-II-vermittelte DNA-Relaxation aus, was darauf hinweist, dass Somemetabolite eine Aktivität gegen menschliche Enzyme aufweisen. Diese in vitro-Wirkungen treten jedoch nur bei Wirkstoffkonzentrationen auf, die deutlich mehr als eine Größenordnung höher sind als die maximalen Patientenplasmakonzentrationen, die für diese Verbindungen beobachtet wurden. Daher gehen wir davon aus, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass Patienten hohe Wirkstoffkonzentrationen erfahren, die für eine Hemmung der menschlichen Topoisomerase erforderlich sind II $\alpha$  und II $\beta$ . Insgesamt gehen wir davon aus, dass die humane Topoisomerase II zwar eine Rolle bei der Inluorchinolon-Toxizität spielen könnte, dass aber wahrscheinlich auch andere Targets beteiligt sind, die identifiziert werden müssen, um Wege zu finden, Patienten vor diesen schwerwiegenden Toxizitäten zu schützen.

## RESULTS AND DISCUSSION

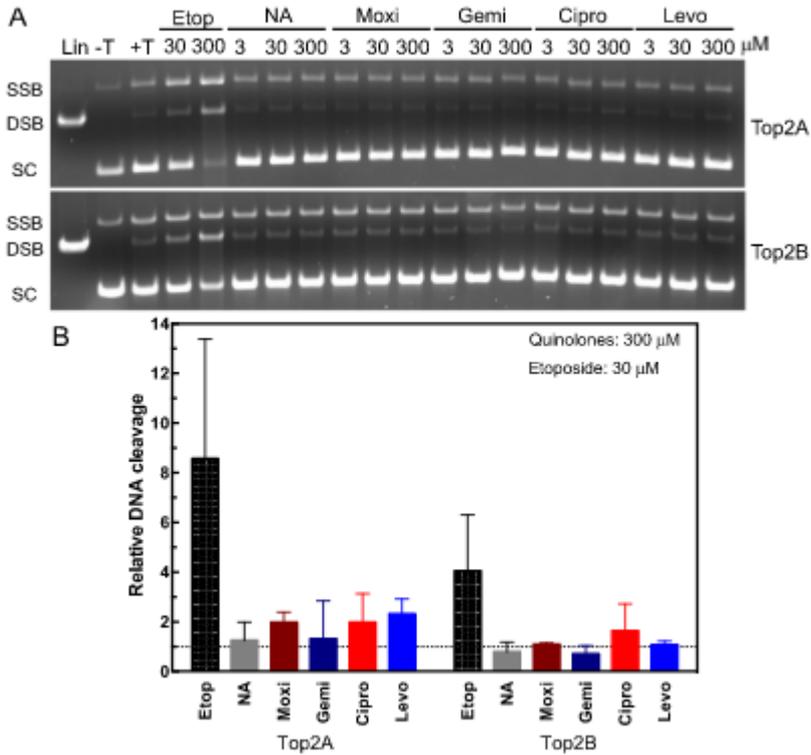
Fluorchinolone erhöhen die DNA-Spaltung durch die Human-Topoisomerase nicht II $\alpha$  oder II $\beta$ . Für die aktuelle Studie wurden drei klinisch verwendete Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin) sowie ein vom Markt genommener Wirkstoff (Gemifloxacin) und das Originalchinolon Nalidixinsäure ausgewählt (Abbildung 1). Um den Einfluss der Fluorchinolone auf menschliche Typ-II-Topoisomerasen zu untersuchen, führten wir eine Reihe von DNA-Spaltungstests durch. In diesen Assays wurde die gereinigte Topoisomerase II $\alpha$  oder II $\beta$  mit einem negativ überdrehten Plasmidsubstrat (pBR322) kombiniert. Die DNA-Spaltung wird durch Beobachtung von eingekerbten und linearisierten Plasmidmolekülen in einem Agarosegel überwacht. Eine frühere Studie hat gezeigt, dass ciprofloxacin die DNA-Spaltung durch Topoisomerase IV.<sup>25</sup> Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, führt Etoposid zu einer Zunahme sowohl der DNA-Einschnitte [Einzelstrangbruch (SSB)] als auch der DSBs. In Patientenserumproben werden Wirkstoffkonzentrationen für Ciprofloxacin zwischen 3 und 30  $\mu$ M (~1-10  $\mu$ g/mL, siehe Tabelle 1) erwartet; daher haben wir einen Bereich bis 300  $\mu$ M getestet, um festzustellen, ob eine Wirkung auf das Enzym vorliegt. Wie aus den quantifizierten Daten hervorgeht, verursachte keines der Fluorchinolone einen so signifikanten Anstieg der DNA-Spaltung bei beiden Isoformen der Topoisomerase II (Abbildung 2, unteres Panel). Dieser Befund stimmt mit den früheren Daten zu Ciprofloxacin und Moxifloxacin aus menschlichen Enzymen überein.<sup>24</sup> Das nichtfluorierte Chinolon, Nalidixinsäure, verursachte ebenfalls keine signifikante Zunahme der DNA-Spaltung. Das Ausbleiben einer Zunahme der DNA-Spaltung unterstützt die Hypothese, dass diese Mittel nicht ähnlich wie ein Etoposid auf die menschliche Topoisomerase II wirken, die hindert das Enzym daran, gespaltene DNA zu ligieren. Dieser Mechanismus wird als "Vergiftung" bezeichnet und findet sich unter verschiedenen Krebsmedikamenten, darunter Etoposid.<sup>14</sup> Es gibt jedoch auch andere Wirkstoffe, die menschliche Topoisomerasen beeinflussen ohne die DNA-Spaltung zu vergiften.<sup>16</sup> Daher untersuchten wir die Fähigkeit der Fluorchinolone, die supercoiled DNA-Relaxationsaktivität der Enzyme zu hemmen, um festzustellen, ob sie als katalytische Inhibitoren der humanen Topoisomerase fungieren. II $\alpha$  oder II $\beta$ . Einige Fluorchinolone hemmen die Topoisomerase-II-vermittelte DNA-Relaxation bei hohen Konzentrationen.<sup>16</sup> Wir untersuchten auch die Fähigkeit der Fluorchinolone, die Relaxation des negativ supercoiled pBR322-Plasmids zu hemmen, indem wir die gleichen Konzentrationsreihen wie in den DNA-Spaltungsexperimenten verwendeten. In Gegenwart

von ATP, human topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  relax das Plasmid, das in Abbildung 3 durch die Umwandlung von supercoiled (SC) Plasmid in entspanntes (Rel) Plasmid in der zweiten Bahn (+T) zu sehen ist. Bei den Fluorchinolonen ist die Hemmung der Relaxation bei den Konzentrationen um 300 $\mu$ M nur bei Gemifloxacin und Ciprofloxacin zu sehen. Interessanterweise konnte Gemifloxacin bei 300 $\mu$ M mit beiden Enzym-Isoformen die Relaxation vollständig hemmen. Ciprofloxacin konnte die Relaxation nur bei der gleichen Konzentration vollständig hemmen, was durch das Vorhandensein niedrigerer DNA-Banden (Topoisomere) belegt ist. Um den Einfluss auf die Relaxation weiter zu testen, wurde eine zusätzliche Serie bei einer Reihe von Wirkstoffkonzentrationen von 10 to 300 $\mu$ M mit Gemifloxacin, Ciprofloxacin und einem Metaboliten von ciprofloxacin, Desethylen-Ciprofloxacin, durchgeführt.<sup>26</sup> Obwohl Fluro-Rochinolone in der verabreichten Form aktiv sind, haben sie einen Unterstoffwechsel, und wir haben untersucht, ob dieser Metabolit eine Aktivität gegen die humane Topoisomerase II aufweist. Wie in Abbildung 4A zu sehen ist, weisen Ciprofloxacin und Desethylen-Ciprofloxacin eine begrenzte Fähigkeit zur Hemmung der Relaxation unter 200-300 $\mu$ M auf. Die Wirkung von Ciprofloxacin im Bereich von 200-300 $\mu$ M stimmt mit den kürzlich unter 80 $\mu$ g/mL berichteten Ergebnissen überein, die to~217 $\mu$ M entsprechen. Im Gegensatz dazu zeigt Gemifloxacin eine signifikante Hemmung der Relaxation bei 50-100 $\mu$ M mit vollständiger Hemmung durch 200 $\mu$ M. Obwohl gezeigt wurde, dass Fluorchinolone mit bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen wie Gifte wirken (d.h. die DNA-Spaltung stabilisieren), zeigen sie in den getesteten Konzentrationsbereichen nicht die gleiche Fähigkeit gegenüber menschlichen Typ-II-Topoisomerasen. Wie oben gesehen, vergiftet Gemifloxacin keine der beiden menschlichen Isoformen, ist aber in der Lage, die Relaxation durch beide Enzyme zu hemmen (>50 $\mu$ M). Dies deutet darauf hin, dass der Mechanismus der Fluorchinolon-induzierten Hemmung für menschliche Enzyme nicht derselbe ist wie der Mechanismus, der bei bakteriellen Enzymen zu beobachten ist, auf den weiter unten eingegangen wird. Es gibt katalytische Inhibitoren humaner Typ-II-Topoisomerasen, die Enzymfunktionen blockieren, ohne die DNA-Spaltung zu stabilisieren.<sup>14,27,28</sup> Diese sind oft mit Interaktionen mit der ATPase-Domäne verbunden, aber sie sind nicht notwendigerweise auf diesen Mechanismus beschränkt. Zusätzliche Studien zu Gemifloxacin werden erforderlich sein, um den Mechanismus zu bestimmen, der der Hemmung der menschlichen Topoisomerase zugrunde liegt II $\alpha$  und II $\beta$ . Da Gemifloxacin vom Markt genommen wurde, werden wir keine weitere Charakterisierung dieser Verbindung gegen menschliche Enzyme vornehmen. Desethylen-Ciprofloxacin vergiftet die Human-Topoisomerase nicht II $\alpha$  oder II $\beta$ . Um zu untersuchen, ob Desethylen-Ciprofloxacin (Abbildung 4B) als Gift für Humantopoisomerase II dienen könnte, haben wir DNA-Spaltungstests mit dieser Verbindung durchgeführt. Wie in Abbildung 4C zu sehen ist, erhöht Desethylen-Ciprofloxacin die Doppelstrang-DNA-Spaltung durch die Humantopoisomerase II $\alpha$  oder II $\beta$  auch in Gegenwart der Verbindung 300 $\mu$ M nicht. Die gleichen Ergebnisse wurden bei niedrigeren Desethylen-Ciprofloxacin-Konzentrationen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

**Abbildung 1:** Strukturen von Chinolonen. Das Vorläuferchinolon, Nalidixinsäure, zusammen mit vier prominenten Fluorchinolonen.



**Abbildung 2:** Spaltung der Plasmid-DNA durch Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  in das Vorhandensein von Chinolonen. A: Die Plasmid-DNA wurde in Abwesenheit (-T) oder Anwesenheit (+T) von Topoisomerase inkubiert II $\alpha$ (Top2A, Topgel) oder  $\beta$ (Top2B, unteres Gel). Das linearisierte Plasmid (Lin) ist in der ersten Bahn dargestellt. Die Reaktionen wurden mit 30 oder 300 $\mu$ M Etoposid(Etop) als Positivkontrolle inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 3, 30, or 300 $\mu$ M von Nalidixinsäure (NA), Moxifloxacin (Moxi), Gemifloxacin(Gemi), Ciprofloxacin (Cipro) oder Levofloxacin (Levo) durchgeführt. Die Positionen von SSB, DSB und supercoiled (SC) DNA sind links angegeben. Es werden repräsentative Gele gezeigt, und die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. B: Die Quantifizierung der Doppelstrang-DNA, die in Abwesenheit von Chinolonen spaltbar ist, wird für beide Topoisomerase-II-Isoformen gezeigt. Als Kontrolle wird Etoposid unter 30 $\mu$ M im Vergleich zu 300 $\mu$ M der Chinolone gezeigt. Die gestrichelte Linie stellt den Grad der Spaltung in Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei oder mehr unabhängigen Experimenten.



**Tabelle 1.** Hemmung der Plasmid-DNA-Relaxationshemmung und maximale Plasmakonzentrationen ausgewählter Fluorchinolone

Relaxationshemmung im gereinigten System Top2A ( $\mu$ g/mL) Top2B ( $\mu$ g/mL) maximale Plasmakonzentrationen<sup>b</sup> ( $\mu$ g/mL)

gemifloxacin 24 (50  $\mu$ M) 24 (50  $\mu$ M) 1,61  $\pm$  0,51

moxifloxacin 6,1  $\pm$  1,3

levofloxacin 9,3  $\pm$  1,6

ciprofloxacin 110 (300  $\mu$ M) 110 (300  $\mu$ M) 5,4

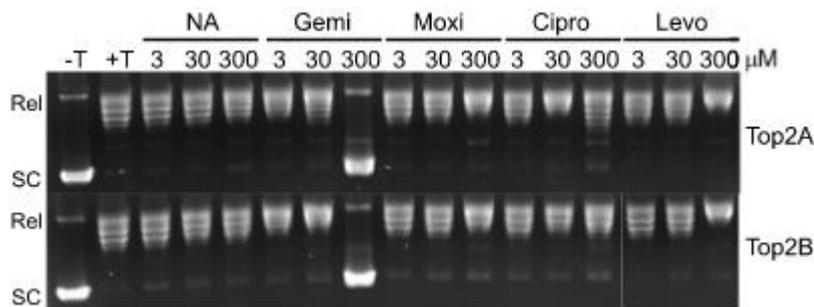
desethylen-ciprofloxacin 110 (300  $\mu$ M) 74-110 (200-300  $\mu$ M) <0,81<sup>a</sup>

	relaxation inhibition in purified system <sup>a</sup>		maximum plasma concentrations <sup>b</sup> ( $\mu$ g/mL)
	Top2A ( $\mu$ g/mL)	Top2B ( $\mu$ g/mL)	
gemifloxacin	24 (50 $\mu$ M)	24 (50 $\mu$ M)	1.61 $\pm$ 0.51
moxifloxacin			6.1 $\pm$ 1.3
levofloxacin			9.3 $\pm$ 1.6
ciprofloxacin	110 (300 $\mu$ M)	110 (300 $\mu$ M)	5.4
desethylen-ciprofloxacin	110 (300 $\mu$ M)	74-110 (200-300 $\mu$ M)	<0.81

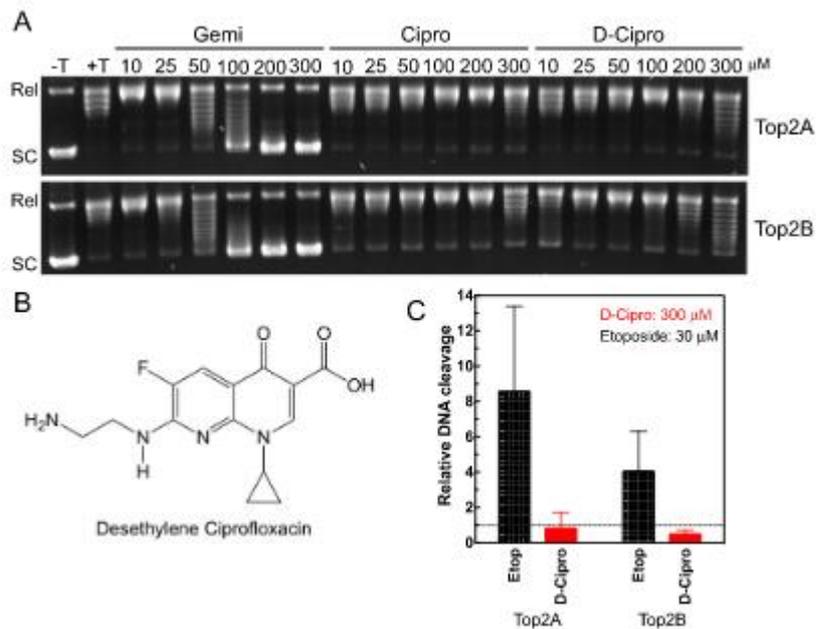
A) Niedrigste Konzentration mit signifikantem Einfluss auf die Relaxation.

B) Konzentrationen basierend auf den höchsten C<sub>max</sub>-Werten aus Packungsbeilagen,<sup>29-32</sup> statistische Fehlerangaben, wo angegeben.

**Abbildung 3.** Durch Topoisomerase vermittelte Plasmid-DNA-Relaxation II $\alpha$  und II $\beta$  in das Vorhandensein ausgewählter Chinolone. Die Plasmid-DNA wurde mit ATP in Abwesenheit (-T) oder Anwesenheit (+T) von Topoisomerase inkubiert II $\alpha$  (Top2A, oberes Gel) oder II $\beta$  (Top2B, unteres Gel). Die Reaktionen wurden mit 3, 30 oder 300  $\mu$ M von Nalidixinsäure (NA), Moxifloxacin (Moxi), Gemifloxacin (Gemi), Ciprofloxacin (Cipro) oder Levofloxacin (Levo) durchgeführt. Die Positionen des entspannten (Rel) und des superspiralisierten (SC) Plasmids sind links dargestellt. Es sind repräsentative Gele dargestellt, und die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.



**Abbildung 4.** Hemmung der Relaxation der Plasmid-DNA in Gegenwart steigender Konzentrationen von Fluorchinolonen. A: Plasmid-DNA wurde mit ATP in Abwesenheit (-T) oder Anwesenheit (+T) von Topoisomerase II $\alpha$  (Top2A, oberes Gel) oder II $\beta$  (Top2B, unteres Gel) inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 10-300  $\mu$ M von Gemifloxacin (Gemi), Ciprofloxacin (Cipro) oder Desethylen-Ciprofloxacin (D-Cipro) durchgeführt. 10300  $\mu$ M von Gemifloxacin (Gemi), Ciprofloxacin (Cipro) oder Desethylen-Ciprofloxacin (D-Cipro). Es sind repräsentative Gele dargestellt, und die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. B: Struktur von Desethylen-Ciprofloxacin. C: Quantifizierte Plasmid-Doppelstrang-DNA-Spaltung mit Topoisomerase II $\alpha$  (Top2A) oder II $\beta$  (Top2B) in Gegenwart von 30  $\mu$ M Etoposid (Etop, schwarze Balken) oder 300  $\mu$ M Desethylen-Ciprofloxacin (D-Cipro, rote Balken) ist dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt den Grad der DNA-Spaltung in Gegenwart von DMSO dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei oder mehr unabhängigen Experimenten.



Obwohl diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Fluorchinolone einen Einfluss auf die gesamte katalytische Aktivität der Humantopoisoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  haben können, ist unklar, ob die beobachteten Konzentrationen klinisch relevant sind. Zu diesem Zweck werden in Tabelle 1 sowohl die Ergebnisse der Plasmid-DNA-Relaxation in einem gereinigten System, die oben besprochen wurden, als auch die in den Packungsbeilagen der Medikamente angegebenen Plasmakonzentrationen zusammengefasst.<sup>29-32</sup> Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, wird erwartet, dass Gemifloxacin unter 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$  und darüber einen signifikanten Einfluss auf die Relaxation hat, was bedeutet, dass es bei Konzentrationen unterhalb dieses Niveaus eine geringere Auswirkung hätte. Umgekehrt wird erwartet, dass Ciprofloxacin und Desethylene-Ciprofloxacin erst bei Konzentrationen über 74-110 $\mu\text{g}/\text{mL}$  einen signifikanten Einfluss auf die Relaxation haben. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, fallen die maximalen Plasmakonzentrationen in den Bereich 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die Plasmakonzentrationen dieser Verbindungen müssten je nach Fluorchinolon 15-100-fach höher sein, um einen Einfluss auf die Topoisomerase-II-Aktivität zu beobachten. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Mehrheit der Patienten, die mit Fluorchinolonen behandelt werden, höchst unwahrscheinlich Plasmakonzentrationen dieser Medikamente erreichen werden, die hoch genug sind, um eine signifikante Störung der Topoisomerase-II-Aktivität zu verursachen.<sup>33,34</sup> Den Daten zufolge beinhaltet diese Interaktion zwei Schlüsselreste in den bakteriellen Enzymen.<sup>33,34</sup> Eine Invariante von Ser(manchmal Thr) und Asp/Glu findet sich in GyrA und ParC/GrlA, die Untereinheiten der heterotetrameren (A2:B2)-Struktur der DNA-Gyrase bzw. Topoisomerase IV sind. Das Fehlen dieser Reste kann zur Resistenz gegen die Vergiftung bakterieller Topoisomerasen durch Fluorchinolone beitragen. Dieser Enzym/Drogen-Wechselwirkungsmechanismus wird auch durch den biochemischen Nachweis mit DNA-Gyrase unterstützt, was darauf hindeutet, dass dies ein allgemeiner Mechanismus für bakterielle Topoisomerasen vom Typ II ist.<sup>35,36</sup> Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, werden diese Rückstände unter repräsentativen Bakterienarten geteilt, von denen bekannt ist, dass sie für Fluorchinolone am anfälligsten sind. Wie bereits früher erwähnt, fehlen diese Rückstände bei menschlichen Typ-II-Topoisomerasen.<sup>24</sup> Zu diesem Zweck haben Aldred et al. gezeigt, dass Mutationen an diesen Positionen in der menschlichen Topoisomerase II $\alpha$ render eine Form sind,

die für eine Vergiftung durch Ciprofloxacin anfällig ist.<sup>24</sup> Basierend auf der Sequenzanalyse würden wir also nicht erwarten, dass die Wildtyp-Human-Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  durch Fluorchinolone vergiftet wird, wenn der Vergiftungsmechanismus die gleichen Interaktionen und Metall-Ionen-Brücken nutzt, die in Bakterienenzymen vorkommen. Unsere Daten zeigen bei einer Gruppe klinisch zugelassener Mittel, dass die humane Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  nicht durch diese Verbindungen vergiftet werden, wie durch die Analyse der Aminosäuresequenzdaten vorhergesagt.

**Abbildung 5.** Ausrichtung der ausgewählten Enzymsequenz an der Region, von der bekannt ist, dass sie an Chinolone bindet. Rot hervorgehoben sind die Positionen der Ser- und Asp/Glu-Reste. Gezeigt sind Sequenzen für die DNA-Untereinheiten GyraseGyrA und Topoisomerase IV ParC/GrlA aus *Escherichia coli* (Ec), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus pneumoniae* (Sp), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) und *Haemophilus influenzae* (Hi). Als auch sind Sequenzen für Homo sapienstopoisomerase II (hTII $\alpha$  und hTII $\beta$ ) dargestellt, denen die an der Chinolonsalzbrücke beteiligten Reste fehlen.

<i>Ec</i> GyrA	GKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPF	96
<i>Ec</i> ParC	GKYHPHGDSACYEAMVLMAQPF	93
<i>Sa</i> GyrA	GKYHPHGDSSEIYEAMVRMAQDF	97
<i>Sa</i> GrlA	GQYHPHGDSSEIYEAMVRLSQDW	93
<i>Sp</i> GyrA	GKYHPHGDSSEIYEAMVRMAQWW	94
<i>Sp</i> GrlA	GNFHPHGDSSEIYDAMVRMSQNW	95
<i>Pa</i> GyrA	GKYHPHGDTAVYDTIVRMAQPF	96
<i>Pa</i> GrlA	GKFHPHGDSACYEAMVLMAQPF	100
<i>Hi</i> GyrA	GKFHPHGDSACYEAMVLMAQPF	97
<i>Hi</i> GrlA	GKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPF	97
hTII $\alpha$	SSYH-HGEMSLMNTIINLAQNF	775
hTII $\beta$	SAYH-HGEALMNTIVNLAQNF	768

**SCHLUSSFOLGERUNGEN** Fluorchinolone stellen eine wichtige Klasse weit verbreiteter Arzneimittel mit einem breiten Wirkungsspektrum sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Infektionen dar. Leider kommt es bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Mittel, darunter toperiphere Neuropathien, Sehnenrupturen, Herzrhythmusstörungen und verschiedene Nebenwirkungen auf die psychische Gesundheit, auf die weiter oben eingegangen wurde. **Es gibt Hinweise darauf, dass Mitochondrialdysfunktionen bei einigen dieser Ereignisse wie Neuropathien und Problemen im Zusammenhang mit Muskeln eine Rolle spielen könnten.**<sup>20-23</sup> Zu diesem Zweck wurde vorgeschlagen, dass Fluorchinolone-vermittelte Störungen der humanen Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ , die in den Mitochondrien vorhanden sind, zu diesen Toxizitäten beitragen könnten.<sup>19</sup> Auf der Grundlage der Beweise, die wir unter Verwendung von drei klinisch relevanten Fluorchinolonen vorgelegt haben, konnten wir keinen Einfluss auf die humane Topoisomerase beobachten II $\alpha$  oder II $\beta$  bei klinisch relevante Arzneimittelkonzentrationen. Unsere Ergebnisse stimmen mit einer aktuellen Studie überein, die darauf hinwies, dass die menschliche Topoisomerase II $\alpha$  und  $\beta$  durch 80 $\mu$ g/mL Ciprofloxacin gehemmt wird, das als Demonstrationsmedikament zu einer Störung der mitochondrialen DNA-Replikation führen könnte.<sup>19</sup> Angesichts der hohen Konzentration, die in dieser früheren Studie verwendet wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die Patienten ausreichende Wirkstoffkonzentrationen erreichen, da die

klinischen Daten diese Art von Auswirkungen auf die Topoisomerase II in den Mitochondrien zeigen.<sup>19</sup> Die mit den Fluorchinolonen verbundenen unerwünschten Ereignisse sind nicht signifikant und erfordern weitere Untersuchungen. Obwohl es möglich ist, dass die humane Topoisomerase II $\alpha$  und / oder II $\beta$  unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit Fluorchinolonen hervorrufen kann, deuten die hier vorliegenden Erkenntnisse darauf hin, dass eine Hemmung der humanen Topoisomerase II wahrscheinlich nicht die Art der klinisch beobachteten unerwünschten Ereignisse erklären kann, weshalb wir vorschlagen, dass weitere potenzielle Arzneimittelziele identifiziert und untersucht werden sollten. Beispielsweise liefern frühere Studien, in denen eine erhöhte Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies und eine verminderte Expression von mitochondrialen Proteinen als Reaktion auf Fluorchinolone nachgewiesen wurde, wertvolle Hinweise zur Identifizierung von Targets in menschlichen Zellen.<sup>22,37</sup> Daher sollten sich die Bemühungen zur Untersuchung dieser unerwünschten Ereignisse darauf konzentrieren, andere Enzyme und Wege zu identifizieren, die durch diese Verbindungen beeinträchtigt werden. ■

**METHODE.** Enzymes und Materialien. humane Wildtyp-Topoisomerase II (TOP2A) und II $\beta$  (TOP2B) wurden in *Saccharomyces cerevisiae* JEL1top1-Zellen exprimiert und wie zuvor beschrieben gereinigt.<sup>28</sup> Beide Enzyme enthalten zu Reinigungszwecken einen C-terminalen His-Tag. Die Enzyme wurden bei -80°C bei 1 mg/ml (4  $\mu$ M für Wildtyp) in 50 mM Tris-HCl, pH 7,7, 0,1 mM EDTA, 750 mM KCl, 5% Glycerin und <40  $\mu$ M Dithiothreitol (DTT) (aus der Enzymzubereitung) gelagert. negativ supercoiled pBR322-DNA wurde aus *E. coli* unter Verwendung eines Plasmid-Mega-Kits (Qiagen) mit einer Modifikation des Herstellerprotokolls hergestellt. Etoposid (Sigma) und Chinolone (Cayman Chemical und LKT) wurden bei 4°C als 20 oder 30 mM Stammlösungen in 100% DMSO bzw. Topoisomerase II $\alpha$ -vermittelten Relaxation der Plasmid-DNA gelagert. Die Reaktionsmischungen enthielten 22 nM Wildtyp-Topoisomerase II $\alpha$ , 5 nM negativ supercoiled pBR322-DNA und 1 mM ATP in 20  $\mu$ L aus 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 175 mM KCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5% Glycerin. Die Assays wurden durch Zugabe von Enzymen gestartet, und DNA-Relaxationsgemische wurden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA-Relaxationsreaktionen wurden in Gegenwart von 1% DMSO (Kontrolle), Etoposid oder steigender Konzentration von Fluorchinolonen durchgeführt. Die DNA-Relaxation wurde durch Zugabe von 3  $\mu$ L einer Stopplösung (77,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,77% SDS) gestoppt. Die Proben wurden mit 2  $\mu$ L Agarosegel-Ladepuffer gemischt, 2 Minuten lang auf 45°C erhitzt und einer Gelelektrophorese in FSME-Agarosegelen von 1% unterzogen. Das Agarosegel wurde dann 15-30 Minuten lang in Ethidiumbromid angefärbt. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht unter Verwendung eines Bio-Rad ChemiDoc MPI Imaging Systems und Image Lab Software (Hercules, CA) sichtbar gemacht. **Die DNA-Relaxation wurde durch die Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in entspannte Topoisomere überwacht.** II $\alpha$ . Die vermittelte Spaltung der Plasmid-DNA wurde mit dem Verfahren von Fortune und Osheroff durchgeführt.<sup>38</sup> Die Reaktionsgemische enthielten 150 nM Wildtyp TOP2A oder TOP2B und 5 nM negativ supercoiled pBR322 DNA in 20  $\mu$ L aus 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5% Glycerin. Die Endreaktionsmischungen enthielten <1  $\mu$ M DTT, was den von der Enzymzubereitung mitgeführten DTT-Rest darstellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Assays durch Zugabe von Enzymen gestartet, und die DNA-Spaltungsmischungen wurden 6 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA-Spaltungsreaktionen wurden in Abwesenheit der Verbindung (1%ige DMSO-Lösung als Kontrolle) oder in Gegenwart von Etoposid durchgeführt, oder steigende Konzentrationen von Fluorchinolonen DNA-Spaltkomplexe wurden durch Zugabe von 2  $\mu$ L von 5% SDS, gefolgt von 2  $\mu$ L von 250 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0, abgefangen. Proteinase K wurde hinzugefügt (2  $\mu$ L einer 0,8 mg/mL Lösung), und die Reaktionsmischungen

wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Digesttopoisomerase II $\alpha$  zu verdauen. Die Proben wurden mit 2 $\mu$ L von Agarosegel gemischt.

(La Jolla, Kalifornien). Die relative DNA-Spaltung wurde berechnet, indem die DNA-Spaltungsniveaus in Anwesenheit von DMSO auf 1,

**AUTHOR INFORMATIONEN** Korrespondierender Autor\*E-mail:joe.deweese@lipscomb.edu gesetzt wurden. Telefon: 615-966-7101.Fax: 615-966-7163.ORCIDJoseph E. Deweese:0000-0001-9683-6723NotizenDie Autoren erklären, dass sie kein konkurrierendes finanzielles Interesse haben.

**ACKNOWLEDGMENTS** Wir danken Dr. Neil Osheroff und Elizabeth Gibson für die kritische Durchsicht des Manuskripts und viele hilfreiche Diskussionen und Jo Ann Byl für die Bereitstellung des Moxifloxacin. Wir danken auch Dr. James Dewar für die hilfreichen Diskussionen. Wir danken Dr. Anni Andersen für die Bereitstellung der Expressionsvektoren fürTOP2A und TOP2B. Diese Arbeit wurde durch Mittel des Lipscomb University College of Pharmacy andHealth Sciences und des Center for Science and Culture unterstützt. C.A.F. und K.G.H. waren Teilnehmer des Sommerforschungsprogramms für Pharmazeutische Wissenschaften des Lipscomb University College of Pharmacy.

**ABBREVIATIONS**DSB:Doppelstrangbruch der DNA; EDTA:Ethylendiamintetraessigsäure; FDA:U.S. Food and Drug Administration;SSB:Einzelstrangbruch der DNA; TOP2:Topoisomerase II

**REFERENCES** (1) Emmerson, A. M.; Jones, A. M. Die Chinolone: jahrzehntelange Entwicklung und Verwendung.J. Antimikrob. Chemother.2003,51,13-20.(2) Mitscher, L. A. Bakterielle Topoisomerase-Inhibitoren: antibakterielle Chinolon- und Pyridon-Wirkstoffe.Chem. Rev.2005,105, 559-592.(3) Bisacchi, G. S. Ursprünge der Chinolonklasse der Antibakteriellen: Eine erweiterte "Entdeckungsgeschichte".J. Med. Chem.2015,58, 4874-4882.(4) Andersson, M. I.; MacGowan, A. P. Entwicklung der Chinolone.J. Antimikrob. Chemother.2003,51,1-11.(5) Appelbaum, P. C.; Hunter, P. A. Die Fluorchinolon-Antibiotika: Vergangenheit, Gegenwart und Zukunftsperspektiven.intra. J. Antimikrob.Agents2000,16,5-15.(6) CDC Ambulante Antibiotika-VerschreibungenVereinigte Staaten, 2016.<https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/programs-measurement/state-local-activities/outpatient-antibiotic-prescriptions-US-2016.html>(Zugriff am 3. Dezember 2018).(7) Mitteilung der FDA zur Arzneimittelsicherheit: Die FDA aktualisiert Warnhinweise für orale und injizierbare Fluorchinolon-Antibiotika wegen behindernder Nebenwirkungen.<https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm511530.htm>(Zugriff am 30. November 2018).(8) "FDA Drug Safety Communication: FDA rät zur Einschränkung der Anwendung von Fluorchinolon-Antibiotika bei bestimmten unkomplizierten Infektionen;warnt vor behindernden Nebenwirkungen, die zusammen auftreten können." <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm500143.htm>(Zugriff am 3. Dezember 2018).(9) Etminan, M.; Brophy, J. M.; Samii, A. Orale Fluorchinolon-Anwendung und Risiko der peripheren Neuropathie: eine pharmakoepidemiologische Studie. Neurologie2014,83, 1261-1263;(10) Aldred, K. J.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Mechanismus der Wirkung und Resistenz von Chinolonen; Biochemie2014,53, 1565-1574;(11) Gibson, E. G.; Ashley, R. E.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. BacterialType II Topoisomerases and Target-Mediated Drug Resistance. Antimikrobielle Resistenz im 21. Jahrhundert. Emerging Infectious Diseases of the 21st Century (Neu auftretende Infektionskrankheiten des 21. Jahrhunderts), Fong, I., Shlaes, D., Drlica, K., Hrsg.; Springer:Cham, 2018.

(12) Champoux, J. J. DNA-Topoisomerasen: Struktur, Funktion und Mechanismus. *annu. Rev. Biochem.* 2001, 70, 369-413. (13) Nitiss, J. L. DNA-Topoisomerase II und ihr wachsendes Repertoire an biologischen Funktionen. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9, 327-337. (14) Murphy, M. B.; Mercer, S. L.; Dewese, J. E. Inhibitoren und Poisons von Säugetier-Topoisomerasen vom Typ II. In *Advances in Molecular Toxicology*, Fishbein, J. C.; Heilman, J., Hrsg.; Academic Press: Cambridge, MA, 2017; Vol. 11, pp 203-240; (15) Dewese, J. E.; Osheroff, N. Die DNA-Spaltungsreaktion der Topoisomerase II: Wolf im Schafspelz; *Nucleic Acids Res.* 2008, 37, 738-748; (16) Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Krebs* 2009, 9, 338-350. (17) Zhang, H.; Zhang, Y.-W.; Yasukawa, T.; Dalla Rosa, I.; Khiati, S.; Pommier, Y. Erhöhte negative Supercoiling von mtDNA in TOP1mt Knockout-Mäusen und Anwesenheit der Topoisomerasen II und II Invertebraten-Mitochondrien. *Nukleinsäuren Res.* 2014, 42, 7259-7267. (18) Pommier, Y.; Sun, Y.; Huang, S.-y. N.; Nitiss, J. L. Rollen dereukaryotischen Topoisomerasen bei Transkription, Replikation und Genomstabilität. *Nat. Pfarrer Mol. Zelle Biol.* 2016, 17, 703-721. (19) Hangas, A.; Aasumets, K.; Kekäläinen, N. J.; Paloheinä, M.; Pohjoismäki, J. L.; Gerhold, J. M.; Goffart, S. Ciprofloxacin beeinträchtigt die Replikationsinitiierung der transmochondrialen DNA durch Hemmung der Topoisomerase 2. *Nukleinsäuren Res.* 2018, 46, 9625-9636; (20) Bernard-Beaubois, K.; Hecquet, C.; Hayem, G.; Rat, P.; Adolphe, M. In-vitro-Untersuchung der Zytotoxizität von Chinolonen an Kaninchenzellen; *Cell Biol. Toxicol.* 1998, 14, 283-292. (21) Lowes, D. A.; Wallace, C.; Murphy, M. P.; Webster, N. R.; Galley, H. F. Das Mitochondrien-gerichtete Antioxidans MitoQ schützt vor Fluorchinolon-induziertem oxidativem Stress und Mitochondrienmembranschäden in menschlichen Achillessehnenzellen. *freies Radikum. Res.* 2009, 43, 323-328. (22) Kalghatgi, S.; Spina, C. S.; Costello, J. C.; Liesa, M.; Morones-Ramirez, J. R.; Slomovic, S.; Molina, A.; Shirihai, O. S.; Collins, J. J. Bakterizide Antibiotika induzieren eine mitochondriale Dysfunktion und oxidative Schädigung in Säugetierzellen. *Sci. Übersetzt. Med.* 2013, 5, 192ra85. (23) Ilgin, S.; Can, O. D.; Atli, O.; Ucel, U. I.; Sener, E.; Guven, I. Ciprofloxacin-induzierte Neurotoxizität: Bewertung möglicher zugrundeliegender Mechanismen. *Toxicol. Mech. Methods* 2015, 25, 374-381. (24) Aldred, K. J.; Schwanz, H. A.; Li, G.; McPherson, S. A.; Turnbough, C. L., Jr.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Überwindung der zielvermittelten Chinolonresistenz in der Topoisomerase IV durch Einführung von Metallionen-unabhängigen Arzneimittel-Enzym-Interaktionen. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 2660-2668. (25) Anderson, V. E.; Gootz, T. D.; Osheroff, N. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of chinolone action. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 17879-17885; (26) Bergan, T.; Thorsteinsson, S. B.; Rohwedder, R.; Scholl, H. Eliminierung von Ciprofloxacin und drei Hauptmetaboliten und Folgen einer verminderten Nierenfunktion. *2009, 35, 393-405 Chemotherapie* 2009, 35, 393-405. (27) Roca, J.; Ishida, R.; Berger, J. M.; Andoh, T.; Wang, J. C. Antitumor-Bisdioxopiperazine hemmen die Hefe-DNA-Topoisomerase II durch Einschluss des Enzyms in Form einer geschlossenen Proteinklemme. *proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 1781-1785. (28) Regal, K. M.; Mercer, S. L.; Dewese, J. E. HU-331 ist ein katalytischer Inhibitor der Topoisomerase II $\alpha$ . *Chem. Res. Toxicol.* 2014, 27, 2044-2051; (29) Cipro (Ciprofloxacinhydrochlorid) [Packungsbeilage]; Bayer HealthCare: West Haven, CT, 2004; (30) Levaquin (Levofloxacin) [Packungsbeilage]; Janssen Pharmaceut-icals, Inc: Titusville, NJ, 2007; (31) Factive (Gemifloxacinmesylat) [Packungsbeilage]; Oscient Pharmaceuticals: Waltham, MA, 2008; (32) Avelox (Moxifloxacinhydrochlorid) [Packungsbeilage]; Bayer HealthCare: Whippany: New Jersey, 2016; (33) Wohlkonig, A.; Chan, P. F.; Fosberry, A. P.; Homes, P.; Huang, J.; Kranz, M.; Leydon, V. R.; Miles, T. J.; Pearson, N. D.; Perera, R. L.;

Shillings, A. J.; Gwynn, M. N.; Bax, B. D. Strukturelle Grundlagen der Quinoloninhibition von Topoisomerasen vom Typ IIA und zielgerichtete Resistenz. *Nat. Struktur. Mol. Biol.* 2010, 17, 1152-1153. (34) Aldred, K. J.; McPherson, S. A.; Turnbough, C. L., Jr.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Topoisomerase IV-Chinolon-Wechselwirkungen werden durch eine Wasser-Metall-Ionen-Brücke vermittelt: mechanistische Grundlage der Chinolon-Resistenz. *Nukleinsäuren Res.* 2013, 41, 4628-4639. (35) Aldred, K. J.; Blower, T. R.; Kerns, R. J.; Berger, J. M.; Osheroff, N. Fluorchinolon-Wechselwirkungen mit *Mycobacterium tuberculosis* gyrase: Verstärkung der Arzneimittelwirkung gegen Wildtyp- und resistente Gyrase. *Proc. Natl. Akad. Sci. U.S.A.* 2016, 113, E839-E846. (36) Ashley, R. E.; Lindsey, R. H., Jr.; McPherson, S. A.; Turnbough, C. L., Jr.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Interaktionen zwischen Quinolones und *Bacillus anthracis* Gyrase und der Grundlage der Arzneimittelresistenz. *biochemistry* 2017, 56, 4191-4200. (37) Nadanaciva, S.; Dillman, K.; Gebhard, D. F.; Shrikhande, A.; Will, Y. High-Content-Screening auf Verbindungen, die die mtDNA-kodierten Proteinspiegel in eukaryotischen Zellen beeinflussen. *J. Biomol. Screening* 2010, 15, 937-948. (38) Fortune, J. M.; Osheroff, N. Merbarone Inhibits the Catalytic Activity of Human Topoisomerase II $\alpha$  by Blocking DNA Cleavage. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 17643-17650.