

Transkriptionsanalyse zur
Identifikation der Eisenaufnahmesysteme
von *Mannheimia haemolytica*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Susanna Christa Röhrig
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2008
(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Erster Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Paul M. Selzer

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Mannheimia haemolytica</i> und <i>Pasteurella multocida</i>	1
1.1.1 Taxonomische Einordnung und verursachte Krankheiten	1
1.1.2 Pathogenese der Infektion der Rinderlunge	4
1.1.3 Übersicht über die Virulenzfaktoren	7
1.2 Eisen: Bedeutung, Toxizität und Virulenz	9
1.3 Eisenaufnahmesysteme gramnegativer Bakterien	11
1.3.1 Transport über die äußere Membran	12
1.3.2 Energie für den Transport über die äußere Membran	15
1.3.3 Transport durch das Periplasma und die innere Membran	16
1.4 Bekannte Eisenaufnahmesysteme bei <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i>	17
1.4.1 <i>Mannheimia haemolytica</i>	17
1.4.2 <i>Pasteurella multocida</i>	19
1.5 Regulation der Eisenaufnahme durch Fur	21
1.6 Die Verwendung der Mikroarray-Technologie zur Transkriptionsanalyse	23
1.7 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Puffer und Lösungen	28
2.1.3 Nährmedien	30
2.1.4 Primer	30
2.1.5 Standard-Marker	31
2.1.6 Proteine	31
2.1.7 Enzym-Kits	31
2.1.8 Kits	31
2.1.9 Bakterienstämme	32
2.1.10 Plasmide	32
2.1.11 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial	33
2.1.11.1 Der Mikroarray	33

2.1.11.2	Weiteres Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial	34
2.1.12	Geräte	34
2.1.13	Software	35
2.2	Etablierung der simultanen Hybridisierung der cDNA von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i> auf den Mikroarray	36
2.3	Mikrobiologische Methoden	40
2.3.1	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	40
2.3.2	Kultivierung von Bakterien.....	40
2.3.2.1	Flüssigkultur von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i>	40
2.3.2.2	Flüssigkultur von <i>E. coli</i>	41
2.3.2.3	Herstellung von Stamm-Kulturen	41
2.3.2.4	Kultivierung und Ernte von Bakterien für die Mikroarray-Studie	41
2.3.3	Berechnung der Verdopplungszeit von Bakterien in Flüssigkultur	43
2.3.4	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	43
2.3.4.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> TOP10	43
2.3.4.2	Herstellung elektrokompenter <i>M. haemolytica</i>	44
2.3.5	Transformation von DNA in Bakterien mittels Elektroporation	44
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	45
2.4.1	Isolierung von RNA	45
2.4.2	Reinigung der RNA von DNA mittels DNaseI-Verdau.....	47
2.4.3	Natrium-Acetat-Fällung von Nukleinsäuren	47
2.4.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	47
2.4.5	Elektrophorese von RNA.....	48
2.4.6	cDNA-Synthese für die Mikroarray-Studie.....	48
2.4.7	cDNA-Synthese für RT-PCR und <i>real time</i> PCR.....	49
2.4.8	Reinigung von cDNA und PCR-Produkten.....	50
2.4.9	Fragmentierung von cDNA mittels DNaseI-Verdau.....	51
2.4.10	Terminale Biotin-Markierung von cDNA	51
2.4.11	Überprüfung der Biotin-Markierung von cDNA mittels Gel-Shift-Assay	51
2.4.12	Hybridisierung der markierten cDNA auf den Mikroarray	52
2.4.13	Waschen, Färben und Scannen der Mikroarrays	53
2.4.14	Auswertung der Mikroarray-Studie	54
2.4.14.1	Qualitätsanalyse der Hybridisierungen und Replikate	54
2.4.14.2	Definition der Gene mit veränderter Transkription.....	55

2.4.15	Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien	56
2.4.16	Plasmid-Präparationen	56
2.4.17	Methylierung von Plasmiden zur Elektroporation in <i>M. haemolytica</i>	57
2.4.18	Denaturierung von DNA zur Elektroporation in <i>M. haemolytica</i>	58
2.4.19	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.4.20	Elektrophorese von DNA	59
2.4.21	Reinigung von DNA aus DNA-Agarose-Gelen	60
2.4.22	Restriktion von DNA	60
2.4.23	Dephosphorylierung von Vektoren	60
2.4.24	Ligation von DNA	61
2.4.25	Sequenzanalyse	62
2.4.26	Northern-Blot-Analyse	62
2.4.27	RT-PCR	64
2.4.28	<i>real time</i> PCR	64
3	Ergebnisse	70
3.1	Transkriptionsprofil von <i>M. haemolytica</i> bei Eisenmangel <i>in vitro</i>	70
3.2	Transkriptionsprofil von <i>P. multocida</i> bei Eisenmangel <i>in vitro</i>	75
3.3	Verifizierung der Mikroarray-Daten	80
3.3.1	Qualitative Verifizierung mit der Northern-Blot-Analyse	81
3.3.2	Quantitative Verifizierung mittels <i>real time</i> PCR	83
3.4	Transkriptomvergleich von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i> bei Eisenmangel	85
3.5	Transkription eisenregulierter Gene von <i>M. haemolytica</i> <i>in vivo</i>	89
3.5.1	Identifikation von eisenregulierten Gen-Transkripten <i>in vivo</i>	89
3.5.2	Bestimmung der quantitativen Transkription von Genen <i>in vivo</i>	90
3.6	Untersuchungen zur Bedeutung des Gens <i>fur</i> bei <i>M. haemolytica</i>	92
3.6.1	Identifikation des Gens <i>fur</i> und seine Regulation unter Eisenmangel	92
3.6.2	Versuche zur Herstellung einer Δ - <i>fur</i> -Mutante in <i>M. haemolytica</i>	93
3.6.3	Hinweis auf die essentielle Funktion des Gens <i>fur</i> in <i>M. haemolytica</i>	100
4	Diskussion	104
4.1	Der Einsatz von Mikroarrays zur Untersuchung bakterieller Transkriptome	104
4.2	Die transkriptionelle Reaktion von <i>M. haemolytica</i> auf Eisenmangel <i>in vitro</i>	105
4.2.1	Genereller Überblick über die Eisenregulation	105
4.2.2	Regulation der Gene für Eisenaufnahmesysteme	107
4.3	Transkriptomvergleich von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i> bei Eisenmangel	112

Inhaltsverzeichnis

4.4	Verifizierung der Mikroarray-Daten.....	116
4.5	Gentranskription von <i>M. haemolytica in vivo</i>	117
4.6	Zur Bedeutung des Gens <i>fur</i> in <i>M. haemolytica</i>	118
4.7	Ausblick.....	121
5	Literatur	123
6	Anhang	134
6.1	Primer	134
6.2	Plasmide pMaha-025a und pMaha-105	137
6.3	Auf dem Mikroarray nicht dargestellte Gene.....	137
6.4	Bakterienkulturen, RNA, cDNA und Mikroarrays.....	139
6.5	Qualitätsindikatoren der Hybridisierungen und Replikate	140
6.6	Mit weiteren Methoden untersuchte Gene	141
	Summary	i
	Lebenslauf	iv
	Danksagung	vi
	Eidesstattliche Versicherung	vii

Zusammenfassung

Mannheimia haemolytica und *Pasteurella multocida* gehören zu den bakteriellen Verursachern der unter Rindern weltweit verbreiteten Enzootischen Bronchopneumonie. Diese schwere Lungenentzündung führt zu beträchtlichen finanziellen Verlusten in der Rinderwirtschaft Europas und Nord-Amerikas. Derzeitige Impfstoffe und Antibiotika, die gegen die Bakterien eingesetzt werden, können die Verbreitung der Krankheit nicht maßgeblich einschränken, weshalb ein Bedarf an neuen Medikamenten besteht.

Bei der initialen Besiedelung der Lunge treffen *M. haemolytica* und *P. multocida* auf Eisenmangel. Die Aufnahme von Eisen ist jedoch ein wesentlicher Faktor bei der Kolonisierung und Persistenz pathogener Bakterien im Wirt, da Eisen essentiell für bakterielles Wachstum ist. Medikamente, die an Proteinen der Eisenversorgung von *M. haemolytica* und *P. multocida* angreifen, können deshalb zur Eindämmung der Bronchopneumonie bei Rindern beitragen.

Um einen Überblick über die Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida* zu erhalten, die bei der Adaptation an Eisenmangel beteiligt sind, wurden die Bakterien in der vorliegenden Arbeit *in vitro* unter Eisenmangel kultiviert, denn die meisten bakteriellen Gene, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind, werden erst bei Eisenmangel transkribiert (Hantke, 2001). Mittels Mikroarray-Analyse der Transkriptome wurden erstmals die *in vitro* eisenregulierten Gene von *M. haemolytica* und erstmals auch die eisenregulierten Gene eines Rinder-Isolats von *P. multocida* identifiziert. Das Transkriptionsprofil eines Rinder-Isolats von *P. multocida* wurde erstellt, um die Transkriptome von zwei nah verwandten Bakterien, die mit der Rinderlunge das gleiche Habitat besiedeln, miteinander vergleichen zu können. Der in dieser Arbeit verwendete Mikroarray war ein Multigenom-Mikroarray und stellt die offenen Leserahmen beider Bakterien dar.

Mit der Mikroarray-Analyse wurden 129 Gene von *M. haemolytica* identifiziert, die bei Wachstum unter Eisenmangel eine veränderte Transkription aufwiesen. Die größte Gruppe der Gene mit verstärkter Transkription bildeten die Gene, die für Rezeptoren und Transporter kodieren. Von diesen kodieren etwa drei Viertel für Proteine, die an der Aufnahme von Eisen aus verschiedenen Quellen beteiligt sind wie Transferrin, Hämoglobin, Hämin und die Xenosiderophore Ferrichrom und Enterobaktin. Die größte Gruppe der Gene mit verminderter Transkription wurde von Genen gebildet, die für Proteine des Energie-Stoffwechsels kodieren. Damit wurde auch für *M. haemolytica* das Prinzip bestätigt, dass Bakterien bei Eisenmangel verstärkt Gene transkribieren, deren Proteine an der Eisenaufnahme beteiligt sind, während Gene für eisenhaltige Proteine des

Zusammenfassung

Energie-Stoffwechsels vermindert transkribiert werden. Für einige dieser Gene wurde die Transkription mit unabhängigen Methoden wie der Northern-Blot-Analyse und der quantitativen *real time* PCR verifiziert.

Bei der Analyse des Transkriptoms des Rinder-Isolats von *P. multocida* wurden 173 Gene mit veränderter Transkription identifiziert. Auch bei *P. multocida* konnte mit der funktionellen Klassifizierung der kodierten Proteine die größte Gruppe an Genen mit verstärkter Transkription den Transport- und Bindungsproteinen zugeordnet werden. Von diesen kodieren zwei Drittel für Proteine, die eine Funktion bei der Eisenaufnahme ausüben. Die größte Gruppe an Genen mit verminderter Transkription wurde auch bei *P. multocida* von Genen gebildet, die für Proteine des Energie-Stoffwechsels kodieren.

Beim Vergleich des Transkriptoms von *M. haemolytica* mit dem von *P. multocida* wurden mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten festgestellt. Nur 40 der 1424 homologen Gene zeigten die gleiche Richtung in der Änderung in der Transkription (verstärkt bzw. vermindert). Unter den 15 homologen Genen mit verstärkter Transkription waren die Gene, die für einen Hämoglobin-Rezeptor der äußeren Membran, die ABC-Transportsysteme FbpABC und YfeABCD sowie das Energie liefernde System TonB-ExbBD kodieren. In den 25 homologen Genen mit verminderter Transkription waren 15 Gene enthalten, die an der anaeroben Atmung beteiligt sind. Dies waren die Proteine NapABCDFGH des Nitrat-Reduktase-Komplexes, die Proteine NrfABCD des Nitrit-Reduktase-Komplexes und die Proteine FrdABCD des Komplexes der Fumarat-Reduktase. Ein auffälliger Unterscheid war, dass bei *M. haemolytica* die gesamten Gene verstärkt transkribiert wurden, deren Proteine an der Aufnahme von Eisen aus Transferrin beteiligt sind. Diese beinhalten den Rezeptor-Komplex TbpAB der äußeren Membran, das ABC-Transportsystem FbpABC für den Transport durch das Periplasma und die innere Membran sowie das System TonB-ExbBD, das die Energie für den Transport durch die äußere Membran überträgt. Bei *P. multocida* dagegen konnte das Gen für den Transferrin-Rezeptor nicht nachgewiesen werden. Somit gehört das in dieser Arbeit verwendete Isolat von *P. multocida* vermutlich zu den 30% der Rinder-Isolate von *P. multocida*, die keinen Transferrin-Rezeptor besitzen, aber die Rinderlunge besiedeln können (Ewers *et al.*, 2006). Daher scheint die Relevanz von Transferrin als Eisenquelle für *M. haemolytica* und *P. multocida* unterschiedlich zu sein. Im Vergleich zu *M. haemolytica* fielen bei *P. multocida* die vielen verstärkt transkribierten Gene auf, die an der Aufnahme von Eisen aus verschiedenen Proteinen und Häm des Bluts beteiligt sind. Die Transkription dieser verschiedenen Transporter deutet auf eine gute Adaptation von

P. multocida für die Verwendung von Eisen aus dem Blut des Wirts hin, die bei *M. haemolytica* in diesem Maß nicht gegeben scheint.

Für *M. haemolytica* wurde die *in vivo*-Relevanz einiger eisenregulierter Gene überprüft, die in der Mikroarray-Analyse eine erhöhte Transkription zeigten. Dazu wurde die RNA untersucht, die aus dem Lungengewebe von infizierten Rindern isoliert worden war. In diesem Gewebe wurde die Transkription von 11 Genen mittels RT-PCR nachgewiesen. Für zwei dieser Gene, die für Hämoglobin-Rezeptoren von *M. haemolytica* kodieren, wurde mittels quantitativer *real time* PCR auch eine Verstärkung der Transkription in Lungengewebe nachgewiesen. Die Verstärkung der Transkription *in vivo* war der transkriptionellen Verstärkung *in vitro* vergleichbar, was auf eine Funktion der Hämoglobin-Rezeptoren bei der Infektion *in vivo* hindeutet. Dies zeigte ebenfalls, dass bei der Mikroarray-Studie ein tatsächlicher Aspekt der Infektion *in vivo* simuliert wurde.

Zur Untersuchung der Regulation des Eisenhaushalts von *M. haemolytica* wurde mit verschiedenen Techniken versucht, das Gen *fur* zu deletieren, das für den Hauptregulator des Eisenhaushalts kodiert, was jedoch nicht gelungen ist. In einem *antisense*-Ansatz konnte jedoch gezeigt werden, dass der Stamm mit dem *fur-antisense*-Plasmid ein signifikant verzögertes Wachstum hatte, was auf die essentielle Funktion des Gens *fur* in *M. haemolytica* hinweist. Ein *antisense*-Ansatz ist noch kein Beweis für die essentielle Funktion eines Gens. Doch die mit Gioia *et al.* (2007) übereinstimmenden Schwierigkeiten bei der Herstellung einer Δ -*fur*-Mutante von *M. haemolytica* sowie das verringerte Wachstum in Gegenwart der *fur-antisense*-mRNA deuten stark auf eine essentielle Funktion dieses Gens hin.

Abkürzungen

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRT	<i>Flp recombinase target</i>
HiFi-Taq	<i>Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>
ID	Identifikationsnummer
kb	Kilobasen
LB	<i>Lennox L Broth Base</i>
MAS	<i>Microarray Suite</i>
MBW	<i>Molecular Biology Water</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NTC	<i>non template control</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Platinum Taq	<i>Platinum Taq DNA Polymerase</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transkription –Polymerase Chain Reaction</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Natrium-Citrat/Natrium-Chlorid
SSPE	Natrium-Chlorid/Natrium-Phosphat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
ZT	Zimmertemperatur

1 Einleitung

1.1 *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella multocida*

1.1.1 Taxonomische Einordnung und verursachte Krankheiten

Mannheimia haemolytica und *Pasteurella multocida* sind gramnegative Bakterien der Familie der *Pasteurellaceae*. Beide Pathogene sind an der Auslösung von schweren Lungen-Infektionen bei Rindern beteiligt und verursachen dadurch einen großen wirtschaftlichen Schaden in der Rindermast (siehe Kapitel 1.1.2). *Pasteurellaceae* sind kokkoide bis kurze Stäbchen (0,2 – 1µm breit und 0,4 – 2µm lang), die unbeweglich sind und aerob oder fakultativ anaerob wachsen (Selbitz, 1992). Sie zeigen eine positive Oxidase- und Katalase-Reaktion, können Nitrate zu Nitrit reduzieren und Kohlenhydrate fermentieren (Selbitz, 1992).

Basierend auf Sequenzanalysen der 16S-ribosomalen RNA und DNA-DNA-Hybridisierungen sind die *Pasteurellaceae* der Klasse der γ -*Proteobacteria* im Stamm der *Proteobacteria* zugeordnet (Brock & Madigan, 1991). Zur Familie der *Pasteurellaceae* gehören neben den Gattungen *Mannheimia* und *Pasteurella* unter anderen auch die Gattungen *Actinobacillus* und *Haemophilus* mit weit verbreiteten Spezies. Die Taxonomie der *Pasteurellaceae* befindet sich in Diskussion und wird kontinuierlich revidiert (Angen *et al.*, 1999a,b; Christensen *et al.*, 2004, Davies, 2004). Die 1999 neu benannte Gattung *Mannheimia* umfasst zurzeit 6 Spezies. Die verschiedenen Stämme werden aufgrund von Kapsel-Antigenen in Serotypen unterteilt. A1, A2, A5 - A9, A12 - A14, A16 und A17 werden bei *M. haemolytica* gefunden, der Serotyp A11 wurde *M. glucosida* zugeordnet. Die Serotypen A3, A4, A10 und A15 sind Trehalose-positiv und wurden der Spezies *M. trehalosi* zugeordnet. (Angen *et al.*, 1999a; Boyce *et al.*, 2004a). Der Gattung *Pasteurella* werden zurzeit etwa 10 Arten zugeordnet. Die Stämme werden durch zwei Antigen-Muster klassifiziert. Basierend auf Kapsel-Antigenen werden die Sero- oder Kapselgruppen A, B, C, D und E unterschieden und basierend auf Antigenen gegen Lipopolysacchride werden die Serotypen 1-16 charakterisiert (Boyce *et al.*, 2004a).

Pasteurellaceae parasitieren die Schleimhäute von Tieren und Menschen. Am häufigsten besiedeln sie den Naso- und Oropharynx sowie den Respirationstrakt, aber auch den Intestinal- und Urogenitaltrakt (Selbitz, 1992; Kehrenberg, 2000). Das Wirkungsspektrum dieser Bakterien ist sehr breit. Sie können als harmlose Kommensale die Schleimhäute der oberen Atemwege bewohnen oder als Krankheitserreger auftreten. Bei ausgelösten

Einleitung

Infektionen werden zwei Pasteurellosen unterschieden: Die primären Pasteurellosen sind klassische Tierseuchen, während die sekundären Pasteurellosen auch als infektiöse Faktorenkrankheiten bezeichnet werden, weil die pathogenen Eigenschaften der Bakterien erst durch ungünstige Umwelteinflüsse oder eine bereits vorhandene Schädigung des Wirts durch andere Krankheitserreger zum Tragen kommen. *Mannheimia*, *Pasteurella* und *Actinobacillus* treten vor allem beim Tier als Krankheitserreger auf, während *Haemophilus* auch beim Menschen Infektionen auslöst (Selbitz, 1992). Außerhalb ihrer Wirtsorganismen haben *Pasteurellaceae* keine lange Überlebensdauer; ihre Übertragungswege sind Tröpfchen-, Schmier- und Biss-Infektionen (Mannheim *et al.*, 1992). Im Folgenden wird nur auf die in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Spezies *M. haemolytica* und *P. multocida* eingegangen.

M. haemolytica (Abb. 1) ist in der Regel ein opportunistisches Pathogen. Es kommt häufig als harmloser Bewohner der Schleimhäute verschiedener Wirte vor, ist aber vor allem bei

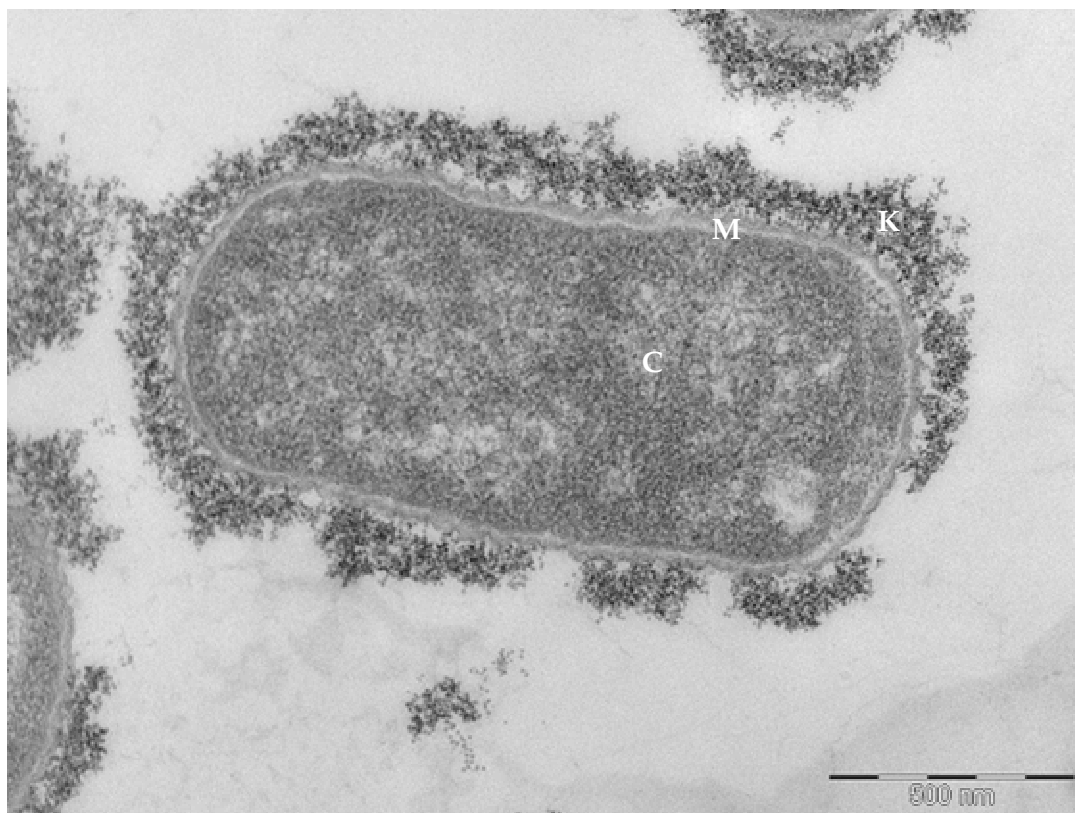


Abb. 1 Elektronen-Mikroskop-Aufnahme von *M. haemolytica* Serotyp A1
Aufnahme der Intervet Innovation GmbH. Es sind das Cytosol (C), die beiden Membranen (M) und die außen vorgelagerte Kapsel (K) von *M. haemolytica* zu sehen.

Wiederkäuern wie Rind, Schaf und Ziege ein Krankheitserreger (Selbitz, 1992; Zecchinon *et al.*, 2005). Beim Rind gilt es als der Hauptverursacher der Enzootischen Bronchopneumonie (siehe Kapitel 1.1.2). Dieser Krankheitskomplex wird im englischen Sprachraum auch als BRDC (*bovine respiratory disease complex*) bezeichnet. Beim Schaf ist *M. haemolytica* ein Erreger von Mastitis, Pneumonie und Septikämie (Selbitz, 1992, Angen *et al.*, 1999a). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte eine komplette Genom-Sequenz in der Gattung *Mannheimia* nur von der Art *M. succiniciproducens* (NCBI, Genbank-Nummer AE016827). Im Oktober 2006 haben Gioia *et al.* die Genom-Sequenz eines *M. haemolytica*-A1-Serotyps veröffentlicht, der aus der Lunge eines Rinds mit BRDC isoliert worden war. Es wurden aber nur einige wenige der 2839 kodierenden Sequenzen annotiert. Die Firma Intervet Innovation GmbH ließ den virulenten bovinen Stamm M7/2 Serotyp A1 von *M. haemolytica* im Jahr 2002 sequenzieren (siehe auch Kapitel 2.1.11.1, Nummer Gi00346 in [http://www.genomesonline.org/gold.cgi?want=Bacterial+Ongoing+Genomes,](http://www.genomesonline.org/gold.cgi?want=Bacterial+Ongoing+Genomes)), doch die Sequenzen sind proprietär.

P. multocida ist die am besten untersuchte Art der Gattung *Pasteurella*. Es ist die einzige Art dieser Gattung, von der ein Serotyp A sequenziert und annotiert wurde. May *et al.* veröffentlichten im Jahr 2001 die Genom-Sequenz des Vogel-Isolats Pm70 von *P. multocida* und bestimmten 2015 offene Leserahmen. *P. multocida* hat ein breites Spektrum an natürlichen Wirten wie Huhn, Pute, Ente, Gans, Kaninchen, Hund, Katze, Schwein, Schaf, Rind oder Büffel (Selbitz, 1992). Als Teil der normalen Flora in gesunden Tieren verschiedener Arten besiedelt es die Schleimhäute des Oropharynx, löst aber bei Gelegenheit Krankheiten aus wie Geflügelcholera, hämorrhagische Septikämie, Enzootische Pneumonie, Rhinitis atrophicans und akute bis chronische respiratorische Infektionen (Selbitz, 1992). Der Mensch gehört nicht zu den natürlichen Wirten von *P. multocida*, aber es kann infolge von Biss- und Kratzwunden von Hunden und Katzen, bei denen *P. multocida* als Kommensal vorkommt, zu Infektionen kommen (Weber *et al.*, 1984; Selbitz, 1992). Die auftretenden Krankheitsbilder beim Menschen können sehr unterschiedlich sein wie z.B. Sinusitis, Sepsis oder Meningitis (Mannheim *et al.*, 1992).

Auf dem deutschen Tierarzneimittel-Markt sind derzeit verschiedene Impfstoffe zur Prophylaxe gegen *M. haemolytica* beim Rind (inaktivierte Vakzine von A1- und A6-Stämmen) zugelassen wie Mabovac® vom Impfstoffwerk Dessau-Tornau, Bovigrip® RSP plus von Intervet, Pastobov® von Merial und Rispoval® Pasteurella von Pfizer. Die therapeutischen Ansätze zur Bekämpfung der sekundären Pasteurellose sind schwierig,

Einleitung

da *P. multocida* und *M. haemolytica* nicht die alleinigen Krankheitserreger sind und beide Bakterien zunehmend resistent gegen Antibiotika wie beta-Lactame, Aminoglykoside, Tetracycline oder Sulfonamide sind (Ungureanu *et al.*, 1981; Highlander 2001; Cusack *et al.*, 2003). Einer der Gründe für die Resistenzentwicklung ist, dass die Antibiotika wegen der schnellen Übertragung der Bakterien nicht nur zur Behandlung eingesetzt werden, sondern auch an den gesamten Tierbestand gegeben werden, wenn einige Tiere offensichtlich erkrankt sind. Die in Deutschland am häufigsten verwendeten Antibiotika gegen *M. haemolytica* und *P. multocida* sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Antibiotika, die in Deutschland zurzeit am häufigsten gegen *M. haemolytica* und *P. multocida* eingesetzt werden

Wirkstoff	Substanzklasse	Handelsname	Hersteller
Enrofloxacin	Quinolon	Baytril	Bayer
Florfenicol	Aminoglycosid	Nuflor	Intervet
Cefquinom	Cephalosporin	Cobactan	Intervet
Tulathromycin	Makrolid	Draxxin	Pfizer
Marbofloxacin	Quinolon	Marbocyl	Vetochas

Quelle: Lila Liste

1.1.2 Pathogenese der Infektion der Rinderlunge

M. haemolytica und *P. multocida* sind am Entstehen verschiedener Infektionen beteiligt. Bei der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der Enzootischen Bronchopneumonie, einer schweren Lungenentzündung bei Rindern. Sie zählt zu den sekundären Pasteurellosen und wird am besten als ein Krankheitskomplex beschrieben, denn sie entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Spezies an Bakterien und Viren. Die Enzootische Bronchopneumonie steht oft auch in Zusammenhang mit Stress erzeugenden Faktoren in der Rinderhaltung. Häufig findet eine Mischinfektion mit *M. haemolytica* und *P. multocida* statt, wobei hier die Pathogenität von *M. haemolytica* größer ist als die von *P. multocida* (Schiefer *et al.*, 1978; Houghton & Gourlay, 1984; Andrews, 1997; Gagea *et al.*, 2006). Die zentrale Rolle von *M. haemolytica* bei dieser Infektion wird damit begründet, dass *M. haemolytica* in reinen Kulturen aus Rinderlungen mit Bronchopneumonie isoliert werden kann und die gleichen Krankheitserscheinungen und Läsionen der Lunge zu beobachten sind, wenn Infektionen mit *M. haemolytica* aus logarithmischer Wachstumsphase experimentell herbeigeführt werden (Ames *et al.*, 1985; Panciera *et al.*, 1984). Der Anteil von *P. multocida* an der Enzootischen Bronchopneumonie ist nicht so

eindeutig belegt. *P. multocida* wird zwar regelmäßig aus erkrankten Rindern isoliert und eine Bronchopneumonie kann auch experimentell durch *P. multocida* bei Rindern hervorgerufen werden (Dowling *et al.*, 2002), jedoch wird zum experimentellen Auslösen einer Infektion eine wesentlich höhere Dosis von *P. multocida* als von *M. haemolytica* benötigt (Dowling *et al.*, 2002). Weiterhin unterscheiden sich die experimentell herbeigeführten Infektionen mit *M. haemolytica* und *P. multocida* in der Pathologie (Ames *et al.*, 1985). Aus den Lungen von Rindern mit Pneumonie werden in erster Linie *M. haemolytica*-Stämme der Serotypen A1 und A6 isoliert (Frank, 1988, Selbitz *et al.*, 2004; Katsuda *et al.*, 2007; Jaramillo-Arango *et al.*, 2008) und bei *P. multocida* vor allem Stämme der Kapselgruppe A (Davies, 2004, Selbitz *et al.*, 2004). Von der enzootischen Bronchopneumonie sind meist Kälber im Alter von 2-8 Wochen und Junggrinder betroffen. Es gibt Untersuchungen aus den USA, die zeigen, dass der wirtschaftliche Verlust, der bei Rindern durch verschiedene Atemwegserkrankungen entsteht, von etwa 3 Milliarden US-Dollar pro Jahr höher ist als der Verlust, der durch andere Rinderkrankheiten entsteht (Griffin, 1997). Für Europa wurde ein wirtschaftlicher Schaden von etwa 576 Millionen EUR pro Jahr ermittelt, der durch Atemwegsinfektionen bei Rindern verursacht wird (Kron, 2003).

Das klinische Bild bei Lungen-Infektionen durch *M. haemolytica* und *P. multocida* ist ähnlich. Die infizierten Tiere zeigen Dyspnoe (Kurzatmigkeit), Husten, Fieber, erhöhte Herzschlagfrequenz, Niedergeschlagenheit, Anorexie, Gewichtsverlust und Nasenausfluss oder eine trockene verkrustete Schnauze (Zecchinon *et al.*, 2005). Sowohl bei Infektionen mit *M. haemolytica* als auch bei Infektionen mit *P. multocida* wurde festgestellt, dass es bei der Erkrankung zu einem massiven Influx von Neutrophilen in die Alveolen kommt (Jeyaseelan *et al.*, 2002). Dies hat verschiedene Reaktionen zur Folge, die zu einer Akkumulation von Fibrin und der Aggregationen von Blutplättchen führen, sowie zu der Zerstörung des Lungenepithels und schließlich zur Nekrose (Jeyaseelan *et al.*, 2002). Die Läsionen des Lungengewebes sind häufig mit bloßem Auge zu erkennen (Abb. 2).

Die Beschreibungen der Pathogenese durch *P. multocida* zeigen kein einheitliches Bild. Dies liegt sicherlich darin begründet, dass *P. multocida* bei verschiedenen Tieren unterschiedliche Krankheitsbilder hervorruft (Selbitz, 1992; Boyce *et al.*, 2004a) und die meisten Virulenz-Untersuchungen mit *P. multocida*-Stämmen mit infizierten Vögeln und Mäusen durchgeführt wurden (Chung *et al.*, 2005; Al hai *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2004; Boucher *et al.*, 2005). Für *M. haemolytica* und die Pathogenese beim Rind existiert schon

Einleitung

seit längerer Zeit eine Vorstellung des Infektionsprozesses, der im Folgenden beschrieben wird.



Abb. 2 Durch *M. haemolytica* geschädigte Rinderlunge

Aufnahme der Intervet Innovation GmbH. Das durch eine experimentelle Infektion mit *M. haemolytica* A1 stark geschädigte Gewebe ist dunkelrot - im Gegensatz zu den nicht befallenen hellen Stellen der Lunge.

Gesunde Kälber können *M. haemolytica* für einen langen Zeitraum im Nasopharynx tragen. Dabei wird vor allem der Serotyp A2 isoliert, während der Serotyp A1 nur in äußerst geringen Mengen vorhanden ist (Frank, 1988). Gelangen bei normaler Atmung wenige Bakterien in die Lunge, werden sie durch die Bewegungen des Flimmerepithels wieder nach außen befördert. Sind die Tiere allerdings bereits erkrankt oder befinden sich in Stress-Situationen, kann es zu einer Schädigung des Flimmerepithels und in Folge zu einer Infektion durch *M. haemolytica* kommen. Zu den wegbereitenden Krankheitserregern, die zur Beeinträchtigung der reinigenden Mechanismen des Flimmerepithels führen und damit die Besiedelung der Bronchien für pathogene Bakterien vereinfachen, werden Viren wie der Bovine Herpes Virus 1 und der Parainfluenza-Virus 3 und Bakterien wie *Mycoplasma bovis* und *Arcanobacterium pyogenes* genannt (Yates, 1982; Frank, 1988; Whiteley *et al.*, 1992; Zecchinon *et al.*, 2005; Gagea *et al.*, 2006). Als Stress-Faktoren zählen unter anderen abrupter Klimawechsel, zu hohe Luftfeuchtigkeit, der Ammoniakgehalt der Luft, Überstallung, zu frühe Entwöhnung, Futterwechsel, Enthornung und häufiger Transport (daher im englischen Sprachraum auch die Bezeichnung „shipping fever“). Die Stress-Faktoren führen zu einer noch nicht geklärten Populations-Explosion des Serotyps A1, wobei die Vermehrung des Serotyps A2 unterdrückt wird (Frank, 1988). Wenn die Anzahl an *M. haemolytica* A1 so groß ist,

dass wiederholt feine Tröpfchen mit Bakterien beim Einatmen in die Lunge gelangen, entwickelt sich eine Pneumonie (Frank, 1988; Mosier, 1997; Ewers *et al.*, 2004).

1.1.3 Übersicht über die Virulenzfaktoren

Durch die Ausbildung von Virulenzfaktoren sind pathogene Bakterien in der Lage Infektionen hervorzurufen (Mahan *et al.*, 2000). Für *M. haemolytica* werden in der Literatur Virulenzfaktoren für die Infektion beim Rind beschrieben (Lo, 2001; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004; Zecchinon *et al.*, 2005). Für die meisten von ihnen steht jedoch der endgültige Beweis ihrer pathogenen Funktion noch aus, da das Erstellen von gezielten Mutanten zum Einsatz in Tierexperimenten nach wie vor mit Schwierigkeiten belastet ist. Einige der Virulenzfaktoren werden dem Infektionsverlauf folgend kurz beschrieben.

Zu den Faktoren, die bei der Kolonisierung des Nasopharynx durch *M. haemolytica* die Adhäsion vermitteln, zählen Fimbrien und Adhäsine (Morck *et al.*, 1987; Potter *et al.*, 1988; Jaramillo *et al.*, 2000). Sekretorische Proteine wie eine Neuraminidase (Straus *et al.*, 1993; Highlander, 2001) und eine Sialoglykoprotease (Abdullah *et al.*, 1991; Shewen *et al.*, 2003) tragen vermutlich auch zur Adhäsion von *M. haemolytica* an die Schleimhaut bei. Die Proteine der äußeren Membran, die an der Aufnahme von Eisen beteiligt sind, werden ebenfalls zu den Virulenzfaktoren gezählt. Sie werden in Reaktion auf Eisenmangel produziert (Hantke, 2001) und häufig als IROMPs (*iron-regulated outer membrane proteins*) bezeichnet. Ihr Anteil an der Pathogenese besteht darin, dass sie dem Wirt Eisen entziehen, welches das bakterielle Wachstum ermöglicht. Es wird vermutet, dass die aus Polysacchariden bestehende Kapsel von *M. haemolytica* an der Adhäsion an die Schleimhaut der Lunge beteiligt ist und so die Kolonisierung vereinfacht (Morck *et al.*, 1988). Dass die Kapsel zur Resistenz gegenüber der Phagozytose und der durch das Komplement-System des Wirts vermittelten Lyse beiträgt, wurde aus Untersuchungen mit einer Kapsel-Mutante von *M. haemolytica* gefolgert (McKerral & Lo, 2002). Das Leukotoxin ist der am besten untersuchte Virulenzfaktor von *M. haemolytica*. Es gehört zu den RTX-Toxinen (*repeats in toxin*), einer Gruppe von Zytolysinen, die zur Bildung von Poren in den Membranen der Zielzellen führen (Frey & Kuhnert, 2002). Die schwach hämolytische Wirkung des Leukotoxins (Murphy *et al.*, 1995) zeigt sich z.B. bei der Bildung von hellen Höfen um Kolonien auf Blutagar-Platten (Abb. 3). Das Leukotoxin ist speziesspezifisch und lysiert nur Makrophagen und Neutrophile von Wiederkäuern (Kaehler *et al.*, 1980; Clinkenbeard & Upton, 1991), was eine Erklärung für die

Einleitung

Wirtsspezifität von *M. haemolytica* sein könnte. Das Leukotoxin ist derzeit der einzige Virulenzfaktor von *M. haemolytica*, dem im Tierexperiment eine wichtige Funktion bei der Infektion nachgewiesen werden konnte. Eine Leukotoxin-Mutante verursachte weniger Läsionen in der Lunge von Rindern als der Wildtyp, obwohl sie den oberen Respirationstrakt besiedeln konnte (Tatum *et al.*, 1998). Eine andere Mutante, die durch die Zerstörung des Gens *lktC* inaktiviertes Leukotoxin exprimierte, zeigte in einem Versuch mit Kälbern ebenfalls eine stark verringerte Virulenz gegenüber dem Wildtyp (Highlander *et al.*, 2000). Verstärkt wird die Wirkung des Leukotoxins durch die Komplexbildung mit dem ebenfalls als Virulenzfaktor beschriebenen Lipopolysaccharid (Zecchinon *et al.*, 2005). Die von *M. haemolytica* sezernierte Superoxid-Dismutase (Rowe *et al.*, 1997) schützt das Bakterium vor schädlichen Sauerstoffradikalen.

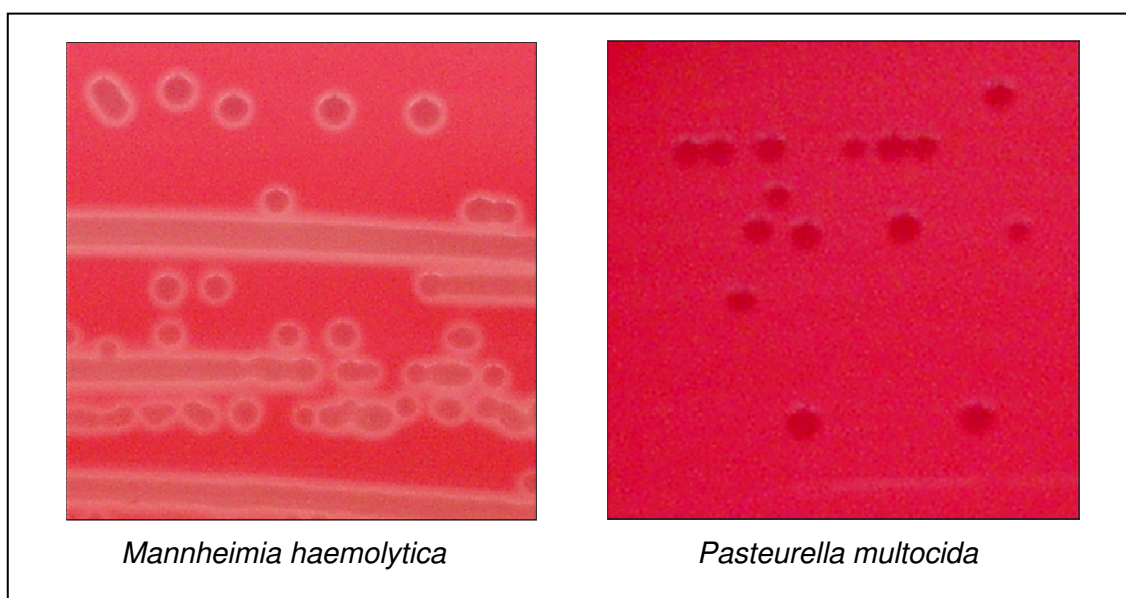


Abb. 3 Wachstum von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf Blutagar-Platten

Bei *M. haemolytica* ist die hämolytische Aktivität durch die hellen Höfe um die Kolonien zu sehen, während *P. multocida* diese hämolytische Aktivität nicht besitzt.

Bei den Virulenzfaktoren von *P. multocida* sind ebenfalls Fimbrien und Adhäsine, eine Neuraminidase und Proteine der äußeren Membran inklusive der Proteine für die Eisenaufnahme, die Kapsel und das Lipopolysaccharid zu nennen. Einige der Virulenzfaktoren wie z.B. die Kapsel oder das Lipopolysaccharid wurden in experimentellen Vogel-Infektionen mit entsprechenden Mutanten bestimmt, worüber unter anderen die Übersichtsartikel von Boyce *et al.* (2004a), Boyce & Adler (2000) und Harper *et al.* (2006) Auskunft geben. Einen großen Fortschritt hatte die Veröffentlichung der Genom-Sequenz von *P. multocida* Pm70, Serotyp A3 (May *et al.* 2001) gebracht, in der

über die Annotation potentielle Virulenzfaktoren identifiziert worden waren. Interessant erscheint, dass *P. multocida*-Stämme, die Geflügelcholera, Septikämie oder Pneumonien verursachen, wahrscheinlich kein Toxin produzieren (Harper *et al.*, 2006). Das bisher einzige identifizierte Toxin von *P. multocida* wird von Stämmen der Serogruppe D produziert und ist bei der *Rhinitis atrophicans* beim Schwein für die klinischen Auswirkungen verantwortlich (Foged *et al.*, 1987; Lax & Chanter, 1990). Im Gegensatz zu *M. haemolytica* zeigt *P. multocida* keine hämolytische Aktivität (Abb. 3).

1.2 Eisen: Bedeutung, Toxizität und Virulenz

Mit Ausnahme der grampositiven *Lactobacilli* (Archibald, 1983) ist Eisen ein essentielles Element für den Stoffwechsel von Bakterien, Zellen und Organismen. Selbst das häufig als eisenunabhängiges Bakterium betrachtete Pathogen *Borrelia burgdorferi* (Erreger der Borreliose), das keine Gene für eisenhaltige Proteine besitzt, benötigt Eisen (Posey & Gherardini, 2000). In Säugern ist Eisen an Proteine gebunden, in denen es häufig in komplexen Gruppen wie Eisen-Schwefel-Clustern oder Häm vorkommt. Seine Funktion als Bestandteil prosthetischer Gruppen oder als Cofaktor vieler Proteine beruht darauf, dass es eines der besten Übergangsmetalle ist. Unter physiologischen Bedingungen kommt es hauptsächlich in zwei Redox-Zuständen vor, die leicht ineinander umzuwandeln sind: in der reduzierten Fe^{2+} -Form und in der oxidierten Fe^{3+} -Form (Andrews *et al.*, 2003). Viele der Proteine, für deren Reaktionen Eisen notwendig ist, sind an lebenswichtigen Prozessen beteiligt, wie Cytochrome, Hydroxygenasen und die Succinat-Dehydrogenase beim Elektronentransport zur Energiegewinnung, die Aconitase im Citrat-Zyklus, die Katalase und die Peroxidase im Sauerstoff-Stoffwechsel, sowie Enzyme der Gen-Regulation, DNA-Biosynthese oder des Aminosäure-Stoffwechsels (Wooldridge & Williams, 1993).

Zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels sowie zur Vermehrung verbraucht ein Bakterium eine bestimmte Menge an Eisen. Abhängig von den Wachstumsbedingungen benötigt z.B. *E. coli* 10^5 bis 10^6 Eisen-Atome pro Zelle, um die notwendige innere Eisen-Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-5} M zu halten (Braun & Killmann, 1999). Vergleichbare Werte wurden auch bei anderen Bakterien gefunden (Weinberg, 1978, Braun & Killmann, 1999; Andrews *et al.*, 2003). Um diese intrazelluläre Eisenkonzentration konstant halten zu können, müssen Bakterien Eisen aktiv aus ihrer Umgebung aufnehmen. Säure-tolerante Bakterien können ihren Eisen-Bedarf mit der direkten Aufnahme von Fe^{3+} decken, das bei pH 3 eine Löslichkeit von 10^{-8} M hat (Braun & Killmann, 1999; Koster, 2005). Unter

Einleitung

anaeroben oder reduzierenden Bedingungen verschiebt sich das Gleichgewicht von der oxidierten Fe^{3+} -Form zur reduzierten Fe^{2+} -Form (Grass, 2006), wobei die Konzentration an freiem Fe^{2+} bei 10^{-10} M liegen kann. Diese Konzentration ist nicht wachstumsbegrenzend (Schlegel, 1992) und kann von anaeroben Bakterien direkt aufgenommen werden (Braun & Killmann, 1999; Grass, 2006). Unter aeroben Bedingungen bei pH 7,4 kommt Eisen als Fe^{3+} in Form von Eisen-Hydroxid ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) vor, das schwer löslich ist und wahrscheinlich mit einer Konzentration von 10^{-18} M vorliegt (Schlegel, 1992; Raymond *et al.*, 2003; Grass, 2006).

Freies Eisen bzw. Fe^{3+} ist bereits bei einer Konzentration von 10^{-18} M toxisch (Raymond *et al.*, 2003) und wird an Proteine gebunden. Abgesehen von den Proteinen mit Eisen als Bestandteil einer funktionellen Gruppe ist Eisen in Bakterien an das Speicherprotein Bakterioferritin gebunden (Andrews *et al.*, 2003). Bei Säugern ist es auf intra- und extrazelluläre Proteine verteilt (Tabelle 2), wobei extrazellulär die freie Konzentration an Eisen bei 10^{-24} M gehalten wird (Braun and Killmann, 1999; Raymond *et al.*, 2003).

Tabelle 2 Eisenhaltige Proteine in Säugern

Lokalisation	Eisenhaltiges Protein
intrazellulär (ca. 99 % des Eisengehalts)	Hämoglobin (74 %)
	Ferritin (16 %)
	verschiedene Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern oder Häm-Verbindungen
extrazellulär	Transferrin (im Serum)
	Laktoferrin (in sekretorischen Flüssigkeiten wie Tränen- und Speichelflüssigkeit und Milch)

Quellen: Wooldridge & Williams, 1993; Braun & Killmann, 1999; Wandersmann & Stojiljkovic, 2000; Raymond *et al.*, 2003

Die Toxizität von Eisen beruht darauf, dass es bei Überschuss unter aeroben Bedingungen zu oxidativem Stress führt, der bis zum Tod von Zellen führen kann. Bei aerobem Metabolismus entstehen natürlicher Weise reaktive Superoxid-Moleküle. Der oxidative Stress wird durch freies Eisen verstärkt, da es vermutlich durch das Superoxid zu Fe^{2+} reduziert wird und die Aufspaltung von Hydrogen-Peroxid zum hoch reaktiven Hydroxyl-Radikal katalysiert (Wardman & Candeias, 1996). Die hoch reaktiven Hydroxyl-Radikale vermindern die Membranflexibilität und es kommt zur Lyse der Bakterien (Andrews *et al.*, 2003). Die Menge an freiem Eisen im Cytosol wird limitiert, indem die Aufnahme von Eisen in Abhängigkeit vom Bedarf kontrolliert stattfindet und

überschüssiges Eisen in Speicherproteinen gebunden wird (Braun, 1997). Der Eisen-Stoffwechsel ist somit streng reguliert und mit den Mechanismen zur Abwehr des oxidativen Stresses gekoppelt (Touati, 2000).

Um ihren eigenen Bedarf an Eisen zu decken, müssen pathogene Bakterien dem Blut oder dem Gewebe ihres Wirts Eisen entziehen. Da im Säuger-Wirt die Konzentration an freiem Eisen außerhalb der Zellen bei 10^{-24} M liegt (siehe oben), stehen im Serum oder auf Schleimhäuten keine ausreichenden Mengen an freiem Eisen für Bakterien zur Verfügung. So befinden sich pathogene Bakterien mit ihrem Wirt im Wettkampf um das Eisen. Sie begegnen dieser Situation mit der verstärkten Expression von Proteinsystemen, die zu einer vermehrten Eisenaufnahme führen (Hantke, 2001). Es wurde nachgewiesen, dass pathogene Bakterien bei Eisenmangel beginnen Virulenzfaktoren zu produzieren wie Toxine oder Oberflächenproteine, zu denen auch die Eisenaufnahme-Proteine gezählt werden. Eisenmangel wird bei diesen Bakterien deshalb als Signal für das Auslösen einer Infektion gewertet (Litwin & Calderwood, 1993; Payne, 1993). Einige Toxine werden sogar nur bei Eisenmangel verstärkt exprimiert, wie z.B. das Diphtheria-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* (siehe Boyd *et al.*, 1990), das Hämolysin von *E. coli* (Litwin & Calderwood, 1993) oder das Exotoxin A von *P. aeruginosa* (Bjorn *et al.*, 1978). Bei ausreichender Eisenversorgung der Pathogene steigt dann die Virulenz (Weinberg, 1978; Litwin & Calderwood, 1993; Payne, 1993; Braun, 2005). Dies wurde für Bakterien gezeigt, die so verschieden sind wie *E. coli* (Bullen *et al.*, 1968), *Pasteurella septica* (Bullen *et al.*, 1971), *Shigella* (Payne, 1989) oder *Yersinia enterocolitica* (Robins-Browne & Prpic, 1985).

1.3 Eisenaufnahmesysteme gramnegativer Bakterien

Die verschiedenen Spezies pathogener Bakterien haben unterschiedliche Systeme zur Eisenaufnahme entwickelt, da sie z.B. unterschiedliche Eisenquellen nutzen. Es ist aber auch nicht selten, dass eine Spezies mehrere Systeme für die gleiche Eisenquelle entwickelt hat, wie z.B. *Neisseria meningitidis* für die Aufnahme von Häm (Stojiljkovic *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1997). Bei gramnegativen Bakterien muss der Transport von Eisen aus der Umgebung über die äußere Membran, das Periplasma und die innere Membran erfolgen, bis es im Cytosol angekommen ist. Dabei werden zwei im Prinzip verschiedene Systeme zur Aufnahme von Eisen unterschieden. Bei einem System werden eisenhaltige Proteine an die äußere Membran gebunden, das Eisen extrahiert und nur Eisen durch das Periplasma ins Cytosol gebracht. Bei dem anderen System werden die eisenhaltigen Moleküle von den Bakterien aufgenommen (Clarke *et al.*, 2001).

Einleitung

Einige der Bakterien, die auch unter anaeroben Bedingungen vorkommen, wie z.B. im Darm oder in einer Vereiterung, haben die Fähigkeit entwickelt, das unter anaeroben Bedingungen stabilere Fe^{2+} direkt aufnehmen zu können. Bei *E. coli* z.B. ist das Proteinsystem mit der Bezeichnung Feo für die direkte Aufnahme von Fe^{2+} charakterisiert worden (Kammler *et al.*, 1993). Bei einigen Bakterien wie z.B. *E. coli* und *Helicobacter pylori* konnte die Aktivität von extrazellulären Reduktasen nachgewiesen werden, die das unlösliche Fe^{3+} zu der löslicheren Form Fe^{2+} reduzieren und so die direkte Aufnahme ermöglichen (Cowart, 2002).

Wenn ausreichende Mengen an Eisen für die Bakterien in ihrer Umgebung zur Verfügung stehen, wird Eisen durch andere Systeme in die Bakterien transportiert als durch die Systeme, die bei Eisenmangel exprimiert werden (Andrews *et al.*, 2003). Viele Eisenaufnahmesysteme werden erst bei Eisenmangel exprimiert, z.B. ChuA von *E. coli* (Torres & Payne, 1997) oder verschiedene Hämin-Rezeptoren von *N. meningitidis* (Lee, 1994). Da in der vorliegenden Arbeit die Eisenmangel-Situation betrachtet wird, werden im Folgenden nur die Eisenaufnahmesysteme beschrieben, die bei Eisenmangel von Bedeutung sind.

1.3.1 Transport über die äußere Membran

Eisen und eisenhaltige Moleküle gelangen bei gramnegativen Bakterien nicht durch Diffusion über die äußere Membran, weil die extrazelluläre Konzentration des Eisens zu niedrig ist und die eisenhaltigen Moleküle zu groß sind; sie werden aktiv über die äußere Membran transportiert. Einige Bakterien können das Eisen-Transportprotein Transferrin des Säuger-Wirts als Eisenquelle nutzen. Transferrin-Rezeptoren wurden bisher vor allem für Vertreter der *Pasteurellaceae* und *Neisseriaceae* beschrieben. Für die Pathogene *N. meningitidis* (Legrain *et al.*, 1993), *Neisseria gonorrhoeae* (Cornelissen *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994), *Haemophilus influenzae* (Gray-Owen *et al.*, 1995) und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gerlach *et al.*, 1992) wurden die Gene für einen zweiteiligen Rezeptor für Transferrin nachgewiesen: TbpAB (*transferrin binding protein A and B*). Der Rezeptor hat nicht nur die Funktion Transferrin zu binden, er extrahiert auch das Eisen aus dem Transferrin und transportiert es durch die äußere Membran. Dieser Rezeptor ist für die Eisenaufnahme von Transferrin essentiell (Cornelissen, 2003). Auch Laktoferrin stellt für einige Bakterien eine Eisenquelle dar. Die Laktoferrin-Rezeptoren bestehen ebenfalls aus zwei Proteinen: LbpAB (*lactoferrin binding protein A and B*). Die Lokalisation und Funktion von LbpAB in der äußeren Membran sind der des Transferrin-Rezeptor-Komplexes

ähnlich (Prinz *et al.*, 1999; Perkins-Balding *et al.*, 2004). Bisher sind die Laktoferrin-Rezeptoren in verschiedenen Spezies der *Neisseriaceae* und der *Moraxellaceae* nachgewiesen worden (Gray-Owen & Schryvers, 1996; Yu & Schryvers, 2002). Ein schematisches Modell von Gray-Owen & Schryvers (1996) zeigt die Ähnlichkeiten der Rezeptoren für Transferrin und Laktoferrin verschiedener Bakterien (Abb. 4).

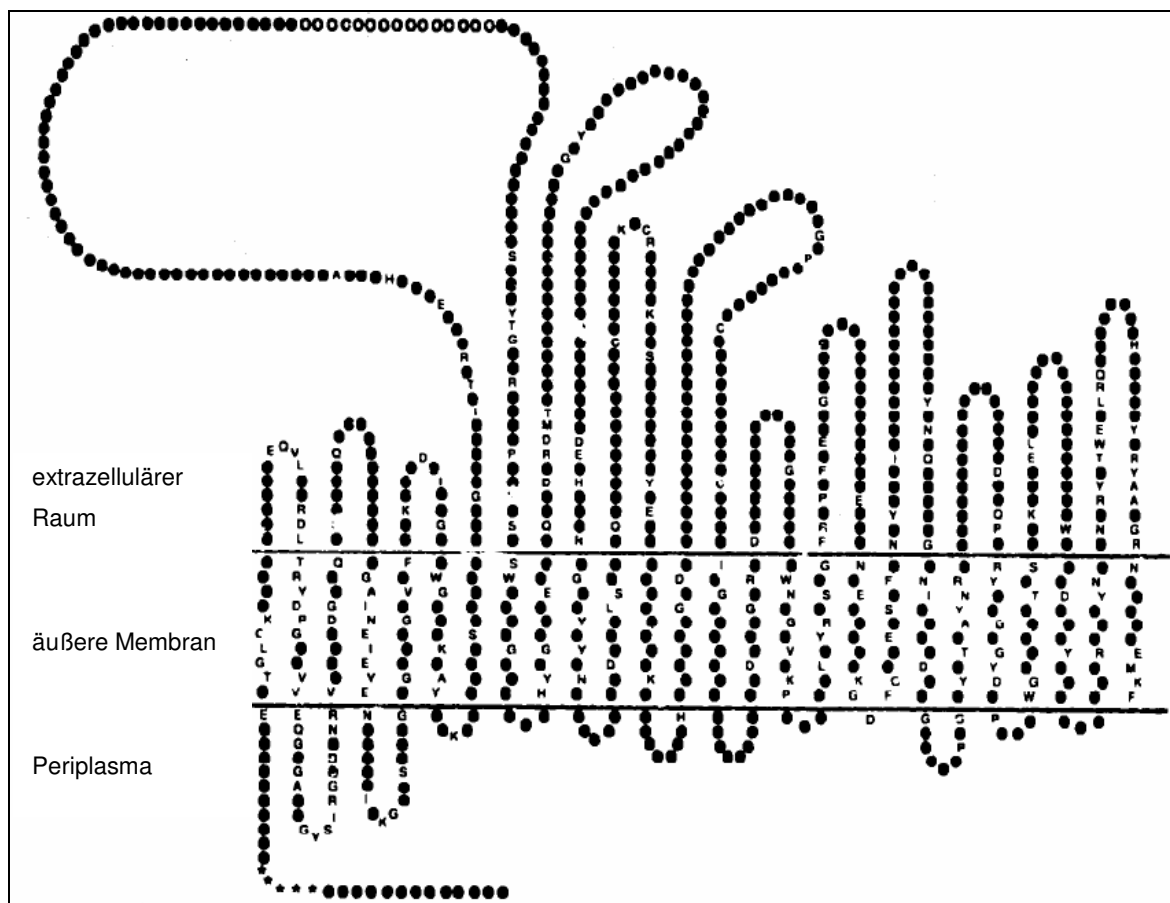


Abb. 4 Topologie-Modell der Transferrin- und Laktoferrin-Rezeptoren A in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien

Quelle: Gray-Owen & Schryvers, 1996. Die Buchstaben kennzeichnen stark konservierte Aminosäuren der TbpA-Sequenzen von *A. pleuropneumoniae*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* und *H. influenzae* sowie der LbpA-Sequenzen von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*. Kreise und Sterne kennzeichnen Aminosäuren mit geringerer Konservierung.

Auch Hämoglobin und der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex können von gramnegativen Bakterien als Eisenquelle verwendet werden. Im Unterschied zur Aufnahme von Eisen aus Transferrin und Laktoferrin wird bei der Eisenaufnahme aus Hämoglobin bzw. Hämoglobin-Haptoglobin das gesamte eisenhaltige Häm-Molekül aus dem Protein herausgelöst und aufgenommen. Der Mechanismus, mit dem Häm aus den Proteinen herausgelöst wird, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Wandersmann & Stojiljkovic,

Einleitung

2000). In der Familie der *Pasteurellaceae* wurden Rezeptoren für Hämoglobin z.B. bei *Haemophilus ducreyi* (Elkins *et al.*, 1995), *H. influenzae* (Maciver *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999), *A. pleuropneumoniae* (Srikumar *et al.*, 2004) sowie *Actinobacillus suis* (Bahrami & Niven, 2005) gefunden.

Einige gramnegative Bakterien sezernieren bei Eisenmangel Siderophore. Dies sind wasserlösliche Substanzen mit einem Peptid-Rückgrad aus analogen, nicht proteinogenen Aminosäuren (Wandersmann & Delepelaire, 2004) und einer Molmasse < 1500 Da. Sie binden nach ihrer Sekretion Fe³⁺ mit so hoher Spezifität und koordinativer Affinität (Affinitätskonstanten um 10³⁰ M⁻¹), dass sie es aus eisenhaltigen Proteinen herauslösen können. Sie transportieren das Eisen zum Bakterium zurück, binden an spezifische Rezeptoren der äußeren Membran und werden durch die äußere Membran geschleust (Braun & Killmann, 1999; Clarke *et al.*, 2001, Raymond *et al.*, 2003). Auch einige Antibiotika werden durch diese Rezeptoren in die Bakterien eingeschleust (Abb. 5). *E. coli* ist das Bakterium, bei dem diese Form der Eisenaufnahme am besten untersucht ist (Braun, 2005; Grass, 2006).

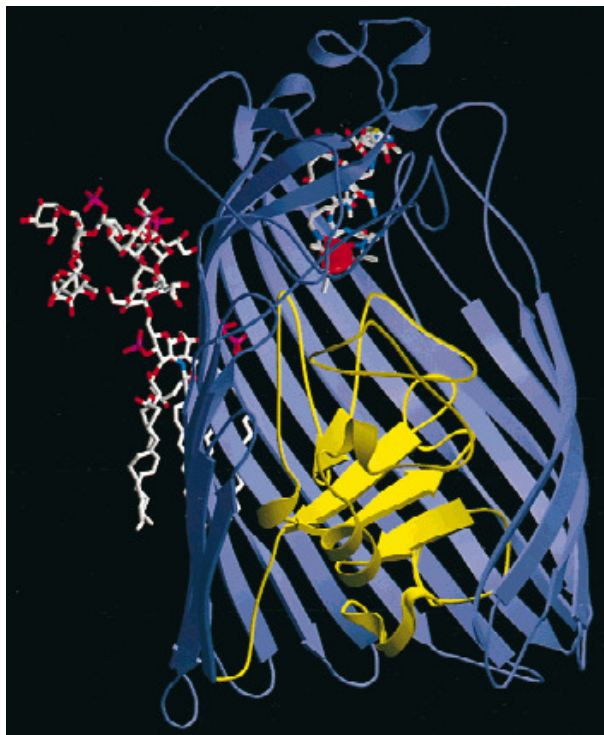


Abb. 5 Struktur des Komplexes aus dem Rezeptor FhuA von *E. coli* mit dem gebundenen Antibiotikum Albomycin und einem assoziierten Lipopolysaccharid
Quelle: Ferguson *et al.*, 2000. Die Ansicht ist rechtwinklig zur äußeren Membran. Zur verbesserten Sicht der inneren Domäne (gelb) sind die Faltblätter (blau) der vorderen Front der Fass-Struktur nicht dargestellt.

Auch Häm kann ähnlich wie ein Siderophor aufgenommen werden. Einige gramnegative Bakterien sezernieren kleine Proteine, Hämophore (HasA), die Häm aus der Umgebung oder aus Proteinen heraus binden können und anschließend von spezifischen Rezeptoren

der äußeren Membran (HasR) wieder vom Bakterium aufgenommen werden. Eine Übersicht dazu gibt der Artikel von Wandersmann und Stojiljkovic aus dem Jahr 2000. Sowohl die Siderophore als auch die Hämophore werden, nachdem sie durch die äußere Membran geschleust wurden, durch das Periplasma und die innere Membran gebracht, was in der Regel von einem ABC-Transport-System bewerkstelligt wird (Kapitel 1.3.3). Wie im Cytosol Eisen aus den Siderophoren oder Hämophoren entnommen wird, ist noch nicht aufgeklärt, doch beide Moleküle werden vom Eisen befreit und regeneriert, so dass sie wieder sekretiert werden können. Für die *Pasteurellaceae Mannheimia*, *Actinobacillus* und *Haemophilus* ist bisher keine Produktion von Siderophoren nachgewiesen worden, aber für *P. multocida* (Kapitel 1.4.2).

1.3.2 Energie für den Transport über die äußere Membran

Für den aktiven Transport von Eisen und eisenhaltigen Molekülen über die äußere Membran gramnegativer Bakterien wird Energie benötigt. Über der äußeren Membran liegt kein Protonengradient und im Periplasma sind keine energiereichen Substanzen wie ATP enthalten, die Energie für diese Transportprozesse liefern könnten. Als Energiequelle für den Transport über die äußere Membran dient der elektrochemische Gradient über der Cytoplasma-Membran. Übertragen wird die Energie von der Cytoplasma-Membran zu den Rezeptoren und Transportern der äußeren Membran durch das Proteinsystem TonB-ExbBD, was am besten in *E. coli* untersucht ist (Braun 1995; Postle & Kadner, 2003). TonB ist mit einer Domäne des N-Terminus in der Cytoplasma-Membran verankert und ragt mit seiner C-terminalen Domäne ins Periplasma; ExbB und ExbD sind integrale Proteine der Cytoplasma-Membran (Abb. 6). Viele Transporter und Rezeptoren der äußeren Membran, die an der Aufnahme von Eisen oder eisenhaltigen Molekülen beteiligt sind, besitzen an ihrem ins Periplasma reichenden N-Terminus eine TonB-Box mit konservierter Sequenz (Clarke *et al.*, 2001). An diese Box bindet die periplasmatische Domäne von TonB und führt wahrscheinlich zu Transformationsänderungen der Rezeptoren, die wiederum zur Aufnahme von Eisen bzw. Häm oder Siderophoren führen. Die Energieübertragung sowie das Zusammenspiel von TonB, ExbB und ExbD sind noch nicht vollständig geklärt, wobei Kristall-Strukturen von Transportern der äußeren Membran mit Fragmenten von TonB wichtige Hinweise liefern (Braun, 2006).

E. coli besitzt ein einziges TonB-ExbBD-System, aber es gibt Bakterien, für die mehrere dieser Systeme beschrieben wurden. *A. pleuropneumoniae*, *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* besitzen zwei TonB-ExbBD-Systeme mit partiell redundanter Funktion (Beddek

Einleitung

et al., 2004; Occhino *et al.*, 1998; Zhao & Poole, 2000). Es gibt aber auch Transportsysteme für Eisen oder eisenhaltige Moleküle durch die äußere Membran von gramnegativen Bakterien, die unabhängig von einem TonB-ExbBD-System sind, wie z.B. für *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* gezeigt wurde (Desai *et al.*, 2000).

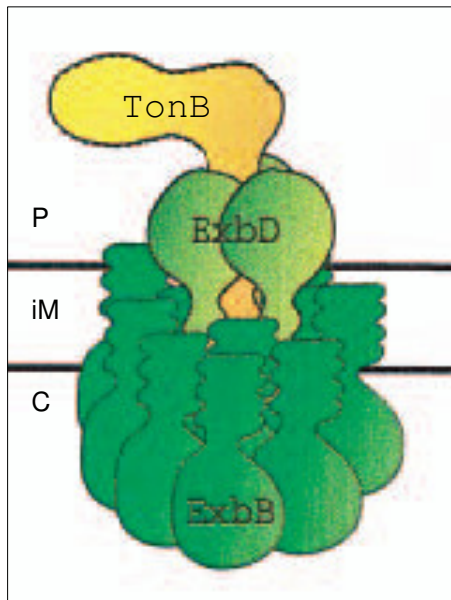


Abb. 6 Schema des Proteinkomplexes TonB-ExbBD

Quelle: Postle & Kader, 2003

P: Periplasma, iM: innere Membran, C: Cytosol

1.3.3 Transport durch das Periplasma und die innere Membran

Ist Eisen, Häm, ein Siderophor oder Hämophor durch die äußere Membran transportiert worden, muss es noch den periplasmatischen Spalt und die innere Membran passieren, um ins Cytosol zu gelangen. In den meisten Fällen wird dies durch ein ABC-Transport-System (*ATP binding cassette transport system*) bewerkstelligt, das bei Prokaryoten aus 3-4 verschiedenen Proteinen besteht (Tabelle 3). Dabei übernimmt ein lösliches periplasmatisches Protein das Eisen oder eisenhaltige Molekül vom Rezeptor bzw. Transporter der äußeren Membran und gibt es an eine Permease der inneren Membran ab, für deren Transportfunktion eine assoziierte ATPase des Cytosols die Energie liefert (Übersicht bei Clarke *et al.*, 2001). In einem Bakterium können unterschiedliche ABC-Transport-Systeme gleichzeitig vorhanden sein. Die Systeme unterscheiden sich z.B. in dem Molekül, das sie transportieren (Eisen, Häm oder Siderophor) oder in ihrer Abhängigkeit von einem Rezeptor der äußeren Membran.

Tabelle 3 Auswahl beschriebener ABC-Transport-Systeme

Spezies	Proteinsystem	Eisenquelle(n)	Literatur
<i>Y. pestis</i>	YfeABC	unbekannt	Bearden & Perry, 1999
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AfeABCD	unbekannt	Rhodes <i>et al.</i> , 2005
<i>A. pleuropneumoniae</i>	AfuABC	Transferrin, Laktoferrin	Chin <i>et al.</i> , 1996
<i>N. meningitidis</i>	FbpABC	Transferrin, Laktoferrin	Khun <i>et al.</i> , 2000
<i>N. gonorrhoeae</i>	FbpABC	Transferrin, Laktoferrin	Adhikari <i>et al.</i> , 1996
<i>H. influenza</i>	HitABC	Transferrin, Laktoferrin	Sanders <i>et al.</i> , 1994
<i>E. coli</i>	Fhu	verschiedene Siderophore	Fecker & Braun, 1983

1.4 Bekannte Eisenaufnahmesysteme bei *M. haemolytica* und *P. multocida*

1.4.1 *Mannheimia haemolytica*

Bei Beginn der vorliegenden Arbeit waren keine umfassenden Informationen zu Eisenaufnahmesystemen von *M. haemolytica* bekannt. Einzelne Untersuchungen hatte es jedoch gegeben. Deneer und Potter (1990) fanden 3 Proteine der äußeren Membran von *M. haemolytica*, die *in vitro* bei Eisenmangel stärker exprimiert wurden als in Vollmedium. Ogunnariwo und Schryvers (1990) identifizierten eines dieser Proteine (TbpA) als Rezeptor für bovines Transferrin. Zum Vergleich zwischen den Proteinen, die *in vitro* und/oder *in vivo* exprimiert wurden, machten Morck *et al.*, (1991) Studien mit *M. haemolytica* in Diffusionskammern, die in die Bauchhöhle von Kaninchen implantiert worden waren. Sie entdeckten 3 Proteine mit ähnlichen Größen wie die unter Eisenmangel *in vitro* identifizierten Membranproteine von Deneer und Potter (1990). Davies *et al.* (1994) untersuchten die Expression von 8 Proteinen der äußeren Membran von *M. haemolytica* bei Wachstum unter verschiedenen Bedingungen. Diese 8 Proteine mit Größen zwischen 18 und ca. 100 kDa wurden unter den 4 verschiedenen Wachstumsbedingungen nicht immer mit gleicher Stärke exprimiert. Unterschiede zeigten sich sowohl zwischen *in vitro*-Kulturen in Voll-Medium und in Eisenmangel-Medium als auch zwischen Bakterien, die aus infizierter Rinderlunge isoliert oder in Diffusionskammern in den Bauchhöhlen von Rindern kultiviert worden waren. Confer *et al.* (1995) kultivierten *M. haemolytica* unter Eisenmangel und impften Rinder mit isolierten Fraktionen der äußeren Membran dieser Bakterien. Es zeigte sich, dass die

Einleitung

Antikörper-Antwort der geimpften Rinder auf ein eisenreguliertes Protein der äußeren Membran mit einer Größe von 70 kDa verstärkt wurde.

Die Gene für einen zweiteiligen Transferrin-Rezeptor TbpAB (*transferrin binding proteins A and B*) bei *M. haemolytica* wurden von Ogunnariwo *et al.* (1997) nachgewiesen. Verschiedene Stämme von *M. haemolytica* konnten *in vitro* Transferrin unterschiedlichen Ursprungs als Eisenquelle verwenden. Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob *M. haemolytica* nur Transferrin aus dem Rind oder auch von anderen Säugern verwenden kann (Ogunnariwo & Schryvers, 1990; Geschwend *et al.*, 1997). Möglicherweise dient Transferrin für *M. haemolytica* bei der Rinderinfektion *in vivo* als eine Eisenquelle (Ewers *et al.*, 2004), aber ein eindeutiger Beweis steht noch aus. Für *M. haemolytica* liegt keine spezielle Literatur zu Rezeptoren für Hämoglobin oder den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex vor. Es gibt jedoch Untersuchungen über die Verwendung von Hämoglobin als einziger Eisenquelle *in vitro*. Ogunnariwo und Schryvers (1990) wiesen nach, dass verschiedene *M. haemolytica*-Stämme bovines Hämoglobin verwenden können, während der von Geschwend *et al.* (1997) verwendete Stamm nicht mit Hämoglobin als einziger Eisenquelle wachsen konnte. Letzteres deutet darauf hin, dass die genetische Ausstattung für die Eisenaufnahme bei *M. haemolytica* variiert. Die Produktion von Siderophoren oder Hämophoren wurde für *M. haemolytica* bisher nicht nachgewiesen, doch wurden Untersuchungen zur Verwendung von Xenosiderophoren des Hydroxamat- oder Phenolat-Typs bei *M. haemolytica* und *P. multocida* durchgeführt (Reissbrodt *et al.*, 1994; Diarra *et al.*, 1996b). Die Ergebnisse der beiden Studien unterschieden sich darin, dass bei Reissbrodt *et al.* (1994) die beiden Pathogene mit einigen Siderophoren als Eisenquelle wachsen konnten, während sie bei Diarra *et al.* (1996b) mit den gleichen Siderophoren nicht wuchsen.

Graham und Lo (1997) identifizierten und charakterisierten das System TonB-ExbBD von *M. haemolytica*. Auch das ABC-Transport-System FbpABC von *M. haemolytica* konnte identifiziert werden (Kirby *et al.*, 1998). Von dem periplasmatischen Protein FbpA von *M. haemolytica* bestimmten Shouldice *et al.* (2003) die Kristallstruktur (Abb. 7). Weitere ABC-Transport-Systeme konnten von Gioia *et al.* (2006) auf der Ebene des Genoms identifiziert werden. Weiterhin identifizierten und charakterisierten Gioia *et al.* (2007) das Protein Fur als transkriptionellen Regulator für die Eisenaufnahme bei *M. haemolytica*.

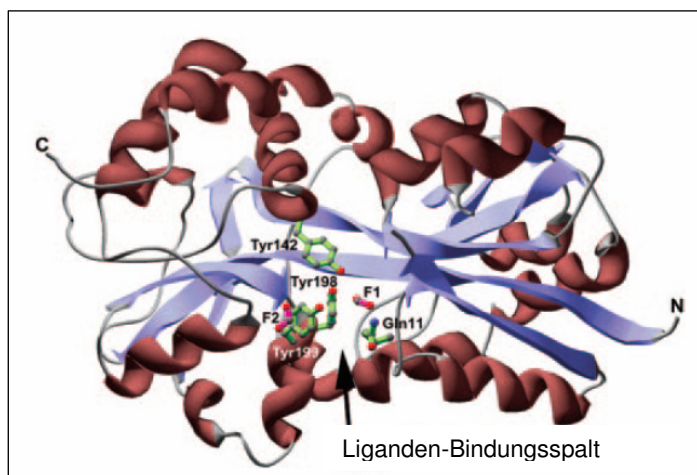


Abb. 7 Struktur des periplasmatischen Proteins FbpA von *M. haemolytica*

Quelle: Shouldice *et al.*, 2003. Es sind zwei Format-Anionen (F1 und F2) zu sehen sowie ein möglicher Eisen-Ligand im Bindungsspalt.

So gibt es kein einheitliches Bild zu den Eisenaufnahmesystemen von *M. haemolytica*, da zwar verschiedene Untersuchungen vorliegen, diese jedoch auf unterschiedlichen Stämmen, meist aus Rindern mit BRDC isoliert, und verschiedenen Methoden beruhen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *M. haemolytica* bei Eisenmangel verschiedene Proteine der äußeren Membran verstärkt exprimiert und verschiedene Stämme Transferrin, Hämoglobin und/oder Siderophore als Eisenquelle verwenden können. In unterschiedlichen Stämmen wurden der TbpAB-Rezeptor-Komplex, das System TonB-ExbBD, das System FbpABC sowie der Regulator Fur identifiziert.

1.4.2 *Pasteurella multocida*

Für *P. multocida* liegen mehr Informationen über die Eisenaufnahme vor als für *M. haemolytica*. Doch für die vorliegende Arbeit waren diese nur bedingt zu verwenden, da die meisten Untersuchungen von *P. multocida* mit Vogel-Isolaten durchgeführt wurden und hier mit einem Rinder-Isolat gearbeitet wurde. Die bestehenden Erkenntnisse werden im Folgenden kurz genannt.

Für verschiedene Vogel- und Rinder-Isolate von *P. multocida* wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot Analysen Proteine identifiziert, die bei Wachstum unter Eisenmangel verstärkt exprimiert wurden (Ruffolo *et al.*, 1998; Borkowska-Opacka & Kedrak, 2002). Diese Proteine stellen möglicherweise Eisenaufnahmesysteme dar, da deren Expression in der Regel durch Eisenmangel induziert wird (Hantke, 2001).

Die Verwendung von Transferrin aus Rind, Schwein und Mensch als einziger Eisenquelle konnte für ein *P. multocida*-Isolat aus Schwein nachgewiesen werden (Geschwend *et al.*, 1997). Für *P. multocida* aus Rind konnte der Transferrin-Rezeptor TbpA identifiziert werden (Ogunnariwo & Schryvers, 2001). Es wurde gezeigt, dass bei *P. multocida* kein Transferrin-Rezeptor-Komplex aus TbpA und TbpB wie bei *M. haemolytica* vorhanden ist,

Einleitung

sondern dass ein einzelner Rezeptor (TbpA) vorliegt (Ogunnariwo & Schryvers, 2001). Hinweise für einen Laktoferrin-Rezeptor bei *P. multocida* gibt es nicht. Bovine Stämme von *P. multocida* können in der Regel Transferrin und Hämoglobin aber kein Laktoferrin als Eisenquelle verwenden (Geschwend *et al.*, 1997; Veken *et al.*, 1998). Dagegen können nicht alle Vogel-Isolate von *P. multocida* Transferrin als Eisenquelle nutzen (Ogunnariwo *et al.*, 1991). Bei den *Pasteurellaceae* wurde nur bei *P. multocida* die Produktion eines Siderophors nachgewiesen, dessen Fe³⁺-Ligand sich von den bereits bekannten unterscheidet (Hu *et al.*, 1986). Untersuchungen zur Verwendung von Xenosiderophoren bei *P. multocida* zeigten widersprüchliche Ergebnisse (siehe Kapitel 1.4.1 (*M. haemolytica*)). Für das Vorhandensein eines Hämophors bei *P. multocida* ist bisher kein Nachweis geführt worden.

Mit der Veröffentlichung der Genom-Sequenz des *P. multocida*-Vogel-Isolats Pm70 (May *et al.*, 2001) wurden mehrere Gene identifiziert, die für Proteine der Eisenaufnahme aus Häm bzw. Hämoglobin kodieren. Bosch *et al.* (2002a) und Cox *et al.* (2003) wiesen nach, dass Hämoglobin-Rezeptor HgbA- und HgbB-Mutanten keine verminderte Virulenz besitzen. Daraus wurde geschlossen, dass die beiden Hgb-Rezeptoren eine redundante Funktion ausüben oder dass es noch weitere Rezeptoren für die Aufnahme von Eisen aus Hämoglobin bei *P. multocida* gibt. Bei nachfolgenden Untersuchungen von Garrido *et al.* (2003) und Bosch *et al.* (2004) wurden weitere Gene und Proteine identifiziert, die bei *P. multocida* an der Eisenaufnahme aus Hämoglobin und Hämin beteiligt sind. Dazu gehören z.B. die Proteine HbpA (*haemin binding protein A*) und HgbA (*haemoglobin binding protein A*), die beide sowohl Hämin als auch Hämoglobin binden.

Bosch *et al.* (2002b) entdeckten, dass die genetische Anordnung des Systems TonB-ExbBD von *P. multocida* dem entspricht, wie sie für andere *Pasteurellaceae* wie *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi* und *M. haemolytica* beschrieben wurde. Außerdem zeigten Bosch *et al.* (2002b), dass die Transkription aller drei Gene durch Eisen reguliert wird, dass sie unabhängig voneinander transkribiert werden und jedes einzelne dieser Gene für die Virulenzausprägung von *P. multocida* notwendig ist. ABC-Transport-Systeme von *P. multocida* wie FbpABC oder YfeABCD wurden bei der Annotation des Genoms von *P. multocida* durch May *et al.* (2001) bestimmt.

1.5 Regulation der Eisenaufnahme durch Fur

Der Eisenhaushalt von Bakterien wird streng reguliert, denn obwohl Eisen für fast alle Bakterien ein essentielles Element ist, führt ein Überschuss zur Bildung von toxischen Hydroxyl-Radikalen (siehe Kapitel 1.2). Bakterien haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um ihre intrazelluläre Eisen-Konzentration in Abhängigkeit von der Eisen-Verfügbarkeit zu kontrollieren. Das lösliche Protein Fur ist einer der Hauptregulatoren des bakteriellen Eisenhaushalts. Über die Funktion von Fur ist am meisten bei *E. coli* bekannt, bei dem es unter anderem die Transkription der Gene reprimiert, die für Proteine der Eisenaufnahme kodieren. Die Repression findet statt, solange ausreichend Eisen verfügbar ist. Bei Eisenmangel wird die Repression durch Fur aufgehoben. Homologe Proteine von Fur sind in vielen anderen gramnegativen Bakterien wie *A. pleuropneumoniae* (Hsu *et al.*, 2003), *H. ducreyi* (Carson *et al.*, 1996), *Y. pestis* (Staggs & Perry, 1991), *Vibrio cholerae* (Litwin *et al.*, 1992), *P. aeruginosa* (Prince *et al.*, 1991) *Neisseria* (Berish *et al.*, 1993, Thomas & Sparling, 1994, 1996), *H. pylori* (Bereswill *et al.*, 1998) und *C. jejuni* (Wooldridge *et al.*, 1994) sowie einigen grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus epidermidis* (Heidrich *et al.*, 1996) und *B. subtilis* (Bsat *et al.*, 1998) gefunden worden. Von *P. aeruginosa* wurde die Kristallstruktur von Fur bestimmt (Pohl *et al.*, 2003). Die Regulation durch Fur findet auf der Ebene der Transkription statt. Die Gene, die negativ durch Fur reguliert werden, besitzen in oder in der Nähe ihrer Promotor-Region einen Bereich mit konservierter Sequenz, die Fur-Box, an die Fur binden kann. Die Fur-Box von *E. coli* besteht von 19 Basen mit palindromer Anordnung (Abb. 8) und gilt als Konsensus-Sequenz der Fur-Box (Escolar *et al.*, 1999). Eine Übereinstimmung von 10 Basen mit dieser Konsensus-Sequenz ist für eine Bindung bereits ausreichend, wie z.B. für *P. aeruginosa* gezeigt wurde (Ochsner & Vasil, 1996).

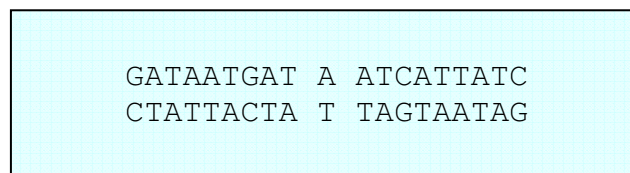


Abb. 8 Basensequenz der Fur-Box von *E. coli* (Escolar *et al.*, 1999)

Die transkriptionelle Repression durch Fur beruht darauf, dass sich bei ausreichender Menge Eisen im Cytosol Homodimere von Fur bilden, die pro Monomer-Untereinheit ein

Einleitung

Fe^{2+} binden. Die Bindung von Eisen steigert die Affinität zur Fur-Box um das 1000-fache (Andrews *et al.*, 2003). Meist binden 2 Fe^{2+} -Fur-Dimere leicht versetzt zueinander von zwei Seiten an die DNA und umschließen sie so. Es können aber auch mehr als zwei Fe^{2+} -Fur-Dimere an die DNA binden, so dass bis zu 100 Basen bedeckt sind (Pohl *et al.*, 2003; Lavrarr *et al.*, 2002). Durch die Bindung von Fe^{2+} -Fur-Dimeren an die Promotor-Region wird die Transkription der entsprechenden Gene inhibiert, da die Bindung der RNA-Polymerase verhindert wird. Fällt die Eisen-Konzentration im Cytosol, löst sich das Fe^{2+} von den Fur-Komplexen und die Affinität zur DNA nimmt ab. Der Repressor löst sich von der Fur-Box in der Promotor-Region und die Transkription der entsprechenden Gene kann statt finden (Abb. 9).

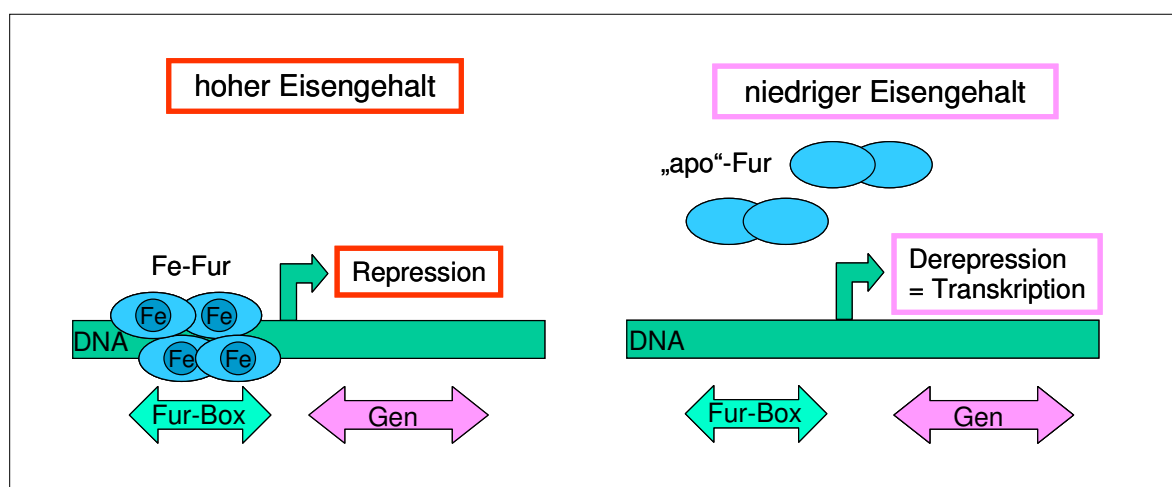


Abb. 9 Regulation der Transkription durch Fur

Abbildung in Anlehnung an Andrews *et al.*, 2003. Bei ausreichender Eisenversorgung binden Fe^{2+} -Fur-Dimere an die Fur-Box in der Promotor-Region und inhibieren die Transkription dieser Gene. Bei niedriger Eisen-Konzentration löst sich das Eisen von den Proteinen und diese binden nicht mehr an die DNA, so dass durch die Derepression die Gene transkribiert werden können.

Die Regulation durch Fur betrifft nicht nur die Eisenaufnahme und -speicherung, sie ist sehr vielfältig und noch nicht erschöpfend erforscht. In den letzten Jahren wurden immer mehr Beweise dafür gefunden, dass Fur auch in andere Stoffwechselprozesse regulatorisch eingreift wie in die Elektronen-Transportprozesse der Atmungskette, den Citrat-Zyklus, die Glykolyse, die Produktion von Toxinen und anderen Virulenzfaktoren, die Säure-Schock-Reaktion, den Schutz vor oxidativem Stress und den Energiestoffwechsel (Delany *et al.*, 2001; McHugh *et al.*, 2003; Mey *et al.*, 2005; Delany *et al.*, 2006). Fur wird daher oft als „globaler“ Regulator bezeichnet. Fur kann z.B. auch als transkriptioneller Aktivator fungieren und die Transkription von eisenhaltigen Proteinen wie der Aconitase A, dem Bakterioferritin, den Fumarasen A und B, der Succinat-Dehydrogenase oder der Superoxid-Dismutase aktivieren, wie McHugh *et al.* (2003)

beschreiben. Diese Aktivierung ist vermutlich indirekt, da die durch Fe²⁺-Fur positiv regulierten Gene in ihrer Promotor-Region keine Fur-Box besitzen. Zumindest in einigen Fällen scheint die durch Fe²⁺-Fur reprimierte regulatorische RNA RhyB involviert zu sein (Masse & Gottesmann, 2002). Eine weitere Möglichkeit der Regulation durch Fur ist für das Ferritin-Gen von *H. pylori* bekannt (Delany *et al.*, 2001). Bei Eisenmangel interagiert das eisenfreie Fur direkt mit der Promotor-Region des Gens und reprimiert dessen Transkription, so dass bei Eisenmangel dieses Eisenspeicher-Protein nicht exprimiert wird. Auch Grifantini *et al.* (2003) beschreiben für *N. meningitidis*, dass bei Eisenmangel vermindert transkribierte Gene eine Fur-Box besitzen.

Untersuchungen mit Δ -fur-Mutanten von *A. pleuropneumoniae* (Jacobsen *et al.*, 2005) und *V. cholerae* (Mey *et al.*, 2005) zeigten, dass diese Mutanten in Infektionsmodellen weniger virulent waren als der entsprechende Wildtyp. Von *P. multocida* wurde von Bosch *et al.*, 2001 eine Δ -fur-Mutante hergestellt, während für *M. haemolytica* bisher keine Δ -fur-Mutante beschrieben wurde.

1.6 Die Verwendung der Mikroarray-Technologie zur Transkriptionsanalyse

Zur Erforschung bakterieller Reaktionen auf veränderte Bedingungen des Milieus eignet sich die seit etwa 15 Jahren (Schena *et al.*, 1995) weiter entwickelte Methode der Mikroarray-Technologie. Unter Nutzung der Tatsache, dass Bakterien auf Veränderungen in ihrer Umgebung durch die Regulation ihrer Gentranskription reagieren (Knippers, 1995), können mit dieser Technik die Transkriptome von Bakterien erfasst werden. Die Mikroarray-Technologie bietet gegenüber herkömmlichen Techniken wie z.B. der RT-PCR den großen Vorteil, dass mit ihr die Transkription aller Gene eines Bakteriums gleichzeitig untersucht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Oligonukleotid-Mikroarray der Firma Affymetrix verwendet. Auf Oligonukleotid-Mikroarrays werden die offenen Leserahmen der Bakterien durch *sets* aus genspezifischen, eindeutigen Oligonukleotiden dargestellt (Lipshutz *et al.*, 1999). Dabei wird nicht das gesamte Gen abgebildet, sondern die Bereiche, die in keinem anderen Gen vorhanden sind (Abb. 10). Die Eindeutigkeit der Nukleotide ist so groß, dass homologe Gene zweier Organismen voneinander unterschieden werden können. Beim Lesen eines Mikroarrays sind die Fluoreszenz-Signale der *probes* umso stärker, je mehr cDNA hybridisiert hat.

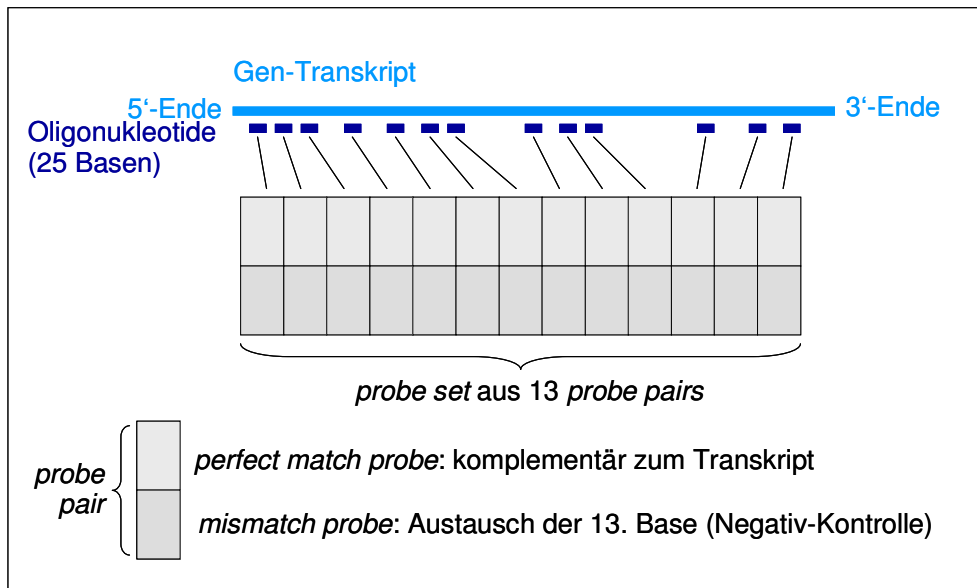


Abb. 10 Schematische Darstellung von offenen Leserahmen auf einem Affymetrix-Mikroarray

Abbildung nach Informationen von Affymetrix. Aus einem Gen-Transkript werden 13 Bereiche mit einer Länge von 25 Basen ausgesucht, die das Gen einzigartig machen und in keinem anderen Gen vorhanden sind. Zu jedem Oligonukleotid, das dem Transkript zu 100% entspricht (*perfect match probe*), wird ein Oligonukleotid mit einem Austausch in der 13. Base erstellt (*mismatch probe*), das als Negativ-Kontrolle dient und ein Maß für die unspezifischen Bindungen ist. Zusammen bilden diese beiden *probes* ein *probe pair*. Die 13 *probe pairs* bilden ein *probe set*, dessen Fluoreszenz-Signale von der Affymetrix-Software MAS nach dem Lesen in einem Fluoreszenzdetektor zu einem einzigen Signalwert (*expression value*) verrechnet und für die Auswertung verwendet werden.

Bei einer Mikroarray-Studie wird aus Bakterien die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Diese wird nach einer Fluoreszenz-Markierung auf den Mikroarray aufgetragen und hybridisiert mit den Oligonukleotiden. Die Fluoreszenz-Signale geben das Maß der Transkription aller auf dem Mikroarray dargestellten Gene wieder. Da mit einem einzelnen Mikroarray nur eine bestimmte Wachstumsbedingung der Bakterien untersucht werden kann, wird das Transkriptom einer Bakterienkultur, die unter Kontroll-Bedingungen kultiviert wurde, ebenfalls analysiert. Der Vergleich dieser beiden Transkriptome zeigt die veränderte Transkription jedes Genes unter den gewählten Versuchsbedingungen.

Bei vielen Bakterien wurden mit der Mikroarray-Technologie die Transkriptionsprofile beim Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* erstellt und analysiert, z.B. von *E. coli* (McHugh *et al.*, 2003), *H. pylori* (Merrell *et al.*, 2003), *C. jejuni* (Palyada *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2005), *N. gonorrhoeae* (Ducey *et al.*, 2005), *Haemophilus parasius* (Melnikow *et al.*, 2005), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Madsen *et al.*, 2006) oder *Y. pestis* (Zhou *et al.*, 2006). Diese Analysen führten zur Identifizierung der eisenregulierten Gene der untersuchten Bakterien. Dazu zählen auch die Gene, die für die Eisenaufnahmesysteme der Bakterien

kodieren, denn diese werden häufig erst bei Eisenmangel transkribiert (Hankte, 2001). Auch mit *P. multocida* wurden bereits mehrere Untersuchungen mittels Mikroarray-Technologie durchgeführt. May *et al.*, 2001, Paustian *et al.*, 2001, 2002 haben das Wachstum von *P. multocida* unter Eisenmangel sowie mit definierten Eisenquellen betrachtet. Boyce *et al.*, 2002 haben mittels Mikroarrays das Transkriptom von *P. multocida* beim infektiösen Wachstum im Blut des natürlichen Wirtes Huhn analysiert. Auch *P. multocida* aus Lebergewebe infizierter Hühner wurde mit der Mikroarray-Technologie untersucht (Boyce *et al.*, 2004b). Für *M. haemolytica* wurden bisher keine Mikroarray-Analysen durchgeführt.

1.7 Zielsetzung

Mannheimia haemolytica und *Pasteurella multocida* gehören zu den bakteriellen Verursachern der Enzootischen Bronchopneumonie, einer unter Rindern weltweit verbreiteten Lungenentzündung. Diese schwere Lungenentzündung führt zu großen finanziellen Verlusten in der Rinderwirtschaft Europas und Nord-Amerikas. Es gibt Impfstoffe und Antibiotika, die die Verbreitung der Krankheit jedoch nicht maßgeblich einschränken können, weshalb ein Bedarf an der Entwicklung neuer Medikamente besteht.

Bei der Kolonisierung der Rinderlunge trifft das Pathogen *M. haemolytica* zunächst auf eine Umgebung, in der es an freiem Eisen mangelt. Da Eisen ein essentieller Faktor für bakterielles Wachstum ist, können Medikamente, die an Proteinen der Eisenversorgung von *M. haemolytica* angreifen, zur Eindämmung der Bronchopneumonie bei Rindern beitragen. Deshalb war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Adaptation von *M. haemolytica* auf diese Eisenmangelumgebung zu untersuchen. Dazu sollte *M. haemolytica* für verschieden lange Zeiträume unter Eisenmangel kultiviert und die durch den Eisenmangel hervorgerufenen transkriptionellen Veränderungen mittels Mikroarray-Technologie bestimmt werden. Dabei sollten insbesondere die Gene für die Eisenaufnahmesysteme von *M. haemolytica* identifiziert werden. Für ein besseres Verständnis der Pathogenese sollte für ausgewählte eisenregulierte Gene die *in vivo*-Transkription bestimmt werden. Dafür sollte die RNA aus mit *M. haemolytica* infizierten Rinderlungen mittels RT-PCR und quantitativer *real time* PCR untersucht werden.

Die verwandten Pathogene *M. haemolytica* und *P. multocida* besiedeln beide die Rinderlunge und nutzen eventuell die gleichen Eisenquellen. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war die Ermittlung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden bei der Adaptation

Einleitung

dieser beiden Pathogene an Eisenmangel. Dazu sollte *P. multocida* *in vitro* unter den gleichen Eisenmangel-Bedingungen wie *M. haemolytica* kultiviert werden. Die mittels Mikroarray-Technologie bestimmte transkriptionelle Antwort von *P. multocida* sollte anschließend mit der von *M. haemolytica* verglichen werden.

M. haemolytica besitzt wie viele gramnegative Bakterien das Regulator-Protein Fur, das einen wesentlichen Einfluss auf die Transkription von eisenregulierten Genen ausübt. Zur Vervollständigung der durch die Mikroarray-Analyse gewonnenen Erkenntnisse zur genomweiten Regulation von eisenabhängigen Genen in *M. haemolytica* sollten die furregulierten Gene von *M. haemolytica* bestimmt werden. Dafür sollte zunächst eine Δ -fur-Mutante in *M. haemolytica* hergestellt werden. Durch eine Mikroarray-Transkriptom-Analyse der Δ -fur-Mutante sollten anschließend die Gene bestimmt werden, deren Transkription durch die Abwesenheit des Regulator-Proteins verändert wurde. Weiterhin sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der transkriptionellen Antwort auf Eisenmangel und dem Verlust des Regulators Fur dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche hier nicht aufgeführten Standard-Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *p.a.* von den Herstellern Merck, Riedel-de-Haen, Roth oder Sigma bezogen. Einige Chemikalien wurden von unterschiedlichen Herstellern verwendet. Diese Chemikalien sind mehrfach aufgeführt.

Für die meisten Anwendungen wurde entmineralisiertes Wasser aus der Hausleitung verwendet, das durch eine Filter-Anlage der Firma USF (Purelab plus UV/UF) gereinigt wurde (H₂O). Für einige Anwendungen wurde jedoch *Nuclease Free Water* oder *Molecular Biology Water* (MBW) verwendet.

Chemikalie	Hersteller (Artikelnummer)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Biorad (161-0156)
Agar	Gibco (30391-049)
Agarose	Sigma (A-9539)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (1.01201.0500)
Ampicillin	Sigma (A-9518)
<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	AES, Frankreich (AEB140102)
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Roth (2315.4)
Bromphenolblau	Merck (1.08122.0005)
Chloramphenicol	Sigma (C-0378)
<i>Control Oligo B2</i>	Affymetrix (900301)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (D-5758)
2, 2'-Dipyridyl (IUPAC-Name: 2-pyridin-2-ylpyridine)	Sigma (D-7505)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (D-5545)
Ethanol	Merck (1009831011)
Ethidiumbromid	Sigma (E-1510)
Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5 M (EDTA)	Sigma (E-7889)
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma (E-5134)
Glycerin	Appllichem (A4443)
<i>Herring Sperm DNA</i>	Promega (D181A 14976307)
Kanamycin	Sigma (K-4000)
<i>Lennox L Broth Base</i> (LB)	Invitrogen (12780-052)
β -Mercaptoethanol	Sigma (M-3148)
<i>Molecular Biology Water</i> (MBW)	Accugene/Cambrex, Belgien (51200)
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Freie Säure	Sigma (M-5287)
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Natrium-Salz	Sigma (M-5057)
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma (M-3183)
Natrium-Acetat, 3 M	Ambion (9740)
Natriumchlorid, 5 M (NaCl)	Ambion (9759)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (4360.1)
dNTPs für die cDNA-Synthese (für die Mikroarrays)	Amersham (27-2035-01)
dNTPs für die PCR	Invitrogen (10297-018)
<i>Nuclease Free Water</i>	Ambion (9930)

Material

Chemikalie	Hersteller (Artikelnummer)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Promega (Z566A)
<i>Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini</i>	Roche (1836170)
<i>Random Primers</i>	Invitrogen (48190-011)
<i>RNAlater</i>	Qiagen (76106)
<i>RNase-Free</i>	Continental Laboratory Products, USA (5454)
S-(5'-Adenosyl)-L-methioninchlorid (SAM)	Fluka (02095)
SSC (20x) (0,3 M NaCitrat pH 7,0, 3 M NaCl)	Appllichem (A1396.1000)
SSPE (20x) (3 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 0,02 M EDTA, pH 7,4)	Accugene/Cambrex, Belgien (51214)
Streptomycin	Sigma (S-6501)
SYBR Gold	Molecular Probes (S-11494)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck (1.10732.0100)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma (T-6066)
Tween 20	Pierce (28320)
Xylencyanol	Sigma (X-4126)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer	Hersteller (Artikelnummer)
Elutionspuffer EB	Qiagen (27106)
10x <i>One-Phor-All Buffer Plus</i>	Amersham (27-0901-02)
<i>Phosphate Buffered Saline, pH 7,2</i>	Invitrogen (20012-019)
5x <i>Sucrose Gel Loading Dye</i>	Amresco, USA (E274-5ml)
10x TBE-Puffer	Appllichem (A3945,1000)

Auftragspuffer für DNA-Agarose-Gele

50% (w/v) Glycerin
10 mM EDTA
0,445 mM Tris pH 8,0
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
0,1 % (w/v) Xylencyanol
> Aufbewahrung bei 4°C

Extraktionspuffer, pH 7,9

20 mM Tris
50 mM Kaliumacetat
5 mM EDTA
1 mM DTT

Hydrolyse-Puffer für die Northern-Blot-Analyse

0,01 N NaOH
3 M NaCl
> frisch angesetzt

Lyse-Puffer, pH 7,8

40 mM Tris
20 mM Natrium-Acetat
1 mM EDTA
1% (v/v) SDS

MES Stammlösung (12x), pH 6,5 – 6,7

1,22 M MES
0,89 M Na⁺ > steril filtriert, bei 4°C dunkel aufbewahrt
(70,4 g MES Freie Säure + 193,3 g MES Natrium-Salz, mit MBW auf 1000 ml aufgefüllt)

2x MES Hybridisierungspuffer

200 mM MES
2 M Na⁺
40 mM EDTA
0,02% (v/v) Tween 20, > steril filtriert, bei 4°C dunkel aufbewahrt
(8,3 ml MES Stammlösung (12x) + 17,7 ml 5 M NaCl + 4 ml 0,5 M EDTA + 0,1 ml 10% Tween 20, mit MBW auf 50 ml aufgefüllt)

MOPS-Puffer (10x), pH 7,0

200 mM MOPS
50 mM Natrium-Acetat
10 mM EDTA
> 0,1% (w/v) DEPC, 2 h bei 37°C gerührt, anschließend autoklaviert
> bei 4°C dunkel aufbewahrt

Puffer TE, pH 8,0

10 mM Tris
1 mM EDTA
> autoklaviert

RNA-Farbstoff, pH 8,0

50% (w/v) Glycerin
1 mM EDTA
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
> Aufbewahrung bei 4°C

RNA-Probenpuffer

66,66 % (v/v) Formamid
13,33 % (v/v) 10x MOPS-Puffer
20 % (v/v) Formaldehyd
> Aufbewahrung bei 4°C, 1x pro Monat frisch angesetzt

Waschlösung für die Herstellung elektrokompetenter *M. haemolytica*

9,3% (w/v) Saccharose
10% (w/v) Glycerin
> steril filtriert

Waschpuffer 1 für die Northern-Blot-Analyse

0,4% (v/v) SDS
0,5x SSC

Waschpuffer 2 für die Northern-Blot-Analyse

2x SSC

Waschpuffer A für den Mikroarray

6x SSPE
0,01% (v/v) Tween 20
> steril filtriert, Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch auf ZT erwärmt

Material

Waschpuffer B für den Mikroarray

100 mM MES

100 mM Na⁺

0,01% (v/v) Tween 20, > steril filtriert, Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln

(83,3 ml MES Stammlösung (12x), 5,2 ml 5 M NaCl, 1 ml 10% Tween 20, mit MBW auf 1000 ml aufgefüllt)

Antibiotika

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden steril filtriert, aliquotiert, für längere Zeiträume bei -20°C aufbewahrt und nach dem Auftauen bei 4°C. Die Stammlösungen wurden vor Zugabe von Bakterien in das flüssige Medium gegeben. Bei Bedarf von Antibiotika in Agar-Platten wurde das Antibiotikum nach dem Autoklavieren in den auf 50°C abgekühlten Agar gegeben.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml

2.1.3 Nährmedien

BHI zur Anzucht von *M. haemolytica* und *P. multocida*

37 g BHI-Pulver in 1000 ml H₂O gelöst, für 15 min im Schnellkochtopf autoklaviert, bei ZT dunkel aufbewahrt. Das Medium wurde in kleinen Mengen (3 Flaschen pro Sterilisierung im Schnellkochtopf) hergestellt, da die Bakterien bei Herstellung größerer Mengen und Sterilisierung im Autoklaven nicht wuchsen.

Medium zum Erstellen von 25%igen Glycerinkulturen von *M. haemolytica* und *P. multocida*
50% Glycerin in BHI, autoklaviert, Aufbewahrung bei ZT

LB-Medium zur Anzucht von *E. coli*

20 g des LB-Pulvers in 1000 ml H₂O gelöst, für 25 min im Autoklaven sterilisiert, bei ZT dunkel aufbewahrt

Medium zum Erstellen von 25%igen Glycerinkulturen von *E. coli*

50% Glycerin in LB, autoklaviert, Aufbewahrung bei ZT

Agar-Platten zur Anzucht aller verwendeten Bakterien

15 g Agar pro 1 Liter Medium wurden vor dem Autoklavieren zugegeben

2.1.4 Primer

Die elektronische Vorhersage der Primer wurde mit dem Programm Vector NTI durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten die Primer, die in die *real time* PCR eingesetzt wurden; sie wurden mit dem Programm Primer Express vorhergesagt (siehe 0). Für die Vorhersage der Primer für Gene von *M. haemolytica* wurden die Sequenzdaten aus dem Genom-Sequenzierungsprojekt (siehe 2.1.11.1) zugrunde gelegt. Für die Vorhersage der Primer für Gene von *P. multocida* wurde die veröffentlichte Sequenz von May *et al.* (2001) verwendet. Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Nach Erhalt wurden die Primer gemäß den Angaben des Herstellers mit MBW zu einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Für alle Anwendungen wurden sie anschließend mit MBW auf eine

Konzentration von 10 µM verdünnt. Im Anhang befinden sich Tabellen der Primer für die verschiedenen Anwendungen (Tabelle 17 bis Tabelle 28).

2.1.5 Standard-Marker

Marker	Hersteller (Artikelnummer)
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker (λ-Marker)	MBI Fermentas (SM0101)
1 Kb <i>Plus DNA Ladder</i> (DNA-Marker)	Invitrogen (10787-026)
RNA-Marker	Sigma (R-7020)

2.1.6 Proteine

Protein	Hersteller (Artikelnummer)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (M0290S)
<i>Biotinylated Antibody</i> (goat-Anti-Streptavidin)	Vector Laboratories (BA-0500)
BSA für die Mikroarrays	Invitrogen (15561-020)
BSA für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (B9001S)
DNaseI	Amersham (27-0514-01)
<i>Goat IgG</i>	Sigma (I-5256)
Lysozym	Sigma (L-6876)
Neutravidin	Pierce (31000)
RNase A	Qiagen (19101)
Streptavidin	Pierce (N21125)
Streptavidin-Phycoerythrin	Molecular Probes (S-866)
<i>SUPERase In</i>	Ambion (2694)
verschiedene Restriktionsendonukleasen	Roche oder New England Biolabs

2.1.7 Enzym-Kits

Enzym-Kit	Hersteller (Artikelnummer)
<i>ABsolute SYBR Green ROX Mix</i>	ABgene, UK (AB-1162)
<i>Bioarray Terminal Labeling Kit</i>	Enzo, USA (900181)
<i>Deoxyribonuclease I</i>	Invitrogen (18068-015)
<i>ECL direct nucleic acid labelling and detection system</i>	Amersham (RPN3000)
<i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> (Platinum Taq)	Invitrogen (10966-034)
<i>Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity</i> (HiFi-Taq)	Invitrogen, Nr. 11304-102
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen (79254)
<i>Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	Invitrogen (11904-018)
<i>SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen (18064-014)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (M0202L)

2.1.8 Kits

Kit	Hersteller (Artikelnummer)
BCA Protein Assay Kit	Pierce (23225)
Pellet Paint Co-Precipitant	Novagen (69049-3)
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen (12263)
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (27106)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (28706)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (28106)
RNeasy Midi Kit	Qiagen (75142)

2.1.9 Bakterienstämme

Bezogene Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
<i>M. haemolytica</i> M7/2	Wildtyp, Serotyp A1, Strep ^r	Rinder-Isolat; Moredun Research Institute, UK
<i>M. haemolytica</i> M7/2 # 118	M7/2 Wildtyp mit Plasmid pMaha-118 (pMaha-016a ohne <i>Pplp4</i> ¹ - <i>cat</i> ²), Strep ^r , Kan ^r	Intervet Innovation GmbH
<i>P. multocida</i> L386	Wildtyp, Serotyp A14	Rinder-Isolat; Prof. L. Wieler, Freie Universität Berlin
<i>E. coli</i> TOP10	elektrokompetent	Invitrogen (44-0035)

Strep: Streptomycin, Kan: Kanamycin

¹*Pplp4*: Promotor des Gens *plp4* aus *M. haemolytica*

²*cat*: kodierendes Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase

Hergestellte Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp
<i>M. haemolytica</i> M7/2 # 357	M7/2 Wildtyp mit Plasmid pMaha-357, Strep ^r , Kan ^r
<i>M. haemolytica</i> M7/2 # 358	M7/2 Wildtyp mit Plasmid pMaha-358, Strep ^r , Kan ^r

Strep: Streptomycin, Kan: Kanamycin

2.1.10 Plasmide

Bezogene Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Herkunft
pCRII-TOPO Vector	β - <i>gal</i> ¹ , Topoisomerase, Kan ^r , Amp ^r	Invitrogen (45-0640)
pMaha-016a*	<i>Pplp4</i> ² - <i>cat</i> ³ , Cm ^r , Kan ^r	Intervet Innovation GmbH
pMaha-025a*	<i>Pplp4</i> ² - <i>cat</i> ³ , Cm ^r	Intervet Innovation GmbH
pMaha-105 ¹	FRT ⁴ - <i>Pplp4</i> ² - <i>cat</i> ³ -FRT ⁴ , Cm ^r	Intervet Innovation GmbH
pMaha-121 ¹	Cm ^r , Kan ^r	Intervet Innovation GmbH

Kan: Kanamycin, Amp: Ampicillin, Cm: Chloramphenicol

*Darstellung der Plasmide im Anhang (6.2)

¹ β -*gal*: kodierendes Gen der β -Galaktosidase

²*Pplp4*: Promotor des Gens *plp4* aus *M. haemolytica*

³*cat*: kodierendes Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase

⁴FRT: Flp *recombinase target*-Sequenz

Hergestellte Plasmide*

Plasmid	Relevante Eigenschaften
pMaha-207	pMaha-121 mit dem Gen <i>fur</i> und seinen flankierenden Regionen anstelle des Gens <i>cat</i> ¹ , Kan ^r
pMaha-209	pMaha-207 mit der Kasette <i>Pplp4</i> ² - <i>cat</i> ¹ anstelle des Gens <i>fur</i> , Kan ^r , Cm ^r
pMaha-210	pMaha-207 mit der Kasette FRT ³ - <i>Pplp4</i> ² - <i>cat</i> ¹ -FRT ³ anstelle des Gens <i>fur</i> , Kan ^r , Cm ^r
pMaha-235	pMaha-121 mit dem mittleren Abschnitt des Gens <i>fur</i> (Position 54-396) innerhalb des Gens <i>cat</i> ¹ , Kan ^r
pMaha-236	pMaha-210 mit <i>PtbpB</i> ⁴ anstelle von <i>Pplp4</i> ² , Kan ^r , Cm ^r
pMaha-249	pCRII-TOPO mit <i>PtbpB</i> ⁴ innerhalb des Gens β - <i>gal</i> ⁵ , Kan ^r , Amp ^r
pMaha-343	pCRII-TOPO mit dem Gen <i>fur</i> in <i>sense</i> -Richtung innerhalb des Gens β - <i>gal</i> ⁵ , Kan ^r , Amp ^r
pMaha-344	pCRII-TOPO mit dem Gen <i>fur</i> in <i>antisense</i> -Richtung innerhalb des Gens β - <i>gal</i> ⁵ , Kan ^r , Amp ^r
pMaha-357	pMaha-016a mit dem Gen <i>fur</i> in <i>sense</i> -Richtung anstelle des Gens <i>cat</i> ¹ , Kan ^r
pMaha-358	pMaha-016a mit dem Gen <i>fur</i> in <i>antisense</i> -Richtung anstelle des Gens <i>cat</i> ¹ , Kan ^r
pMaha-359	durch inverse PCR Position 123-6545 von pMaha-210, Kan ^r , Cm ^r
pMaha-360	durch inverse PCR Position 3238-3183 von pMaha-359, Kan ^r , Cm ^r

Kan: Kanamycin, Cm: Chloramphenicol, Amp: Ampicillin

*Darstellung der Plasmide mit ihrer Klonierungsstrategie in den Ergebnissen Kapitel 3.6

¹*cat*: kodierendes Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase

²*Pplp4*: Promotor des Gens *plp4* aus *M. haemolytica* (konstitutiv transkribiert)

³FRT: Flp *recombinase target*-Sequenz

⁴*PtbpB*: Promotor des Gens *tbpB* aus *M. haemolytica* (besitzt eine Fur-Box)

⁵ β -*gal*: kodierendes Gen der β -Galaktosidase

2.1.11 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

2.1.11.1 Der Mikroarray

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroarray (GeneChip CustomExpress Advantage Array, HPM Saa 520004 F, Artikelnummer 520004) wurde von der Firma Affymetrix für die Firma Intervet hergestellt. Auf dem Multigenom-Mikroarray sind die offenen Leserahmen von *M. haemolytica* und *P. multocida* dargestellt. Die Sequenzinformationen für *P. multocida* Pm70 beruhen auf der Veröffentlichung von May *et al.*, 2001. Die Sequenzinformationen für *M. haemolytica* M7/2 stammten aus einem Genom-Sequenzierungsprojekt, das von der Firma Intervet Innovation GmbH in Auftrag gegeben und vom deutschen Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wurde (BMBF Nummer 0312219). Im Rahmen dieses Projektes wurden 95% des Genoms von *M. haemolytica* M7/2 sequenziert. Die Analyse der Sequenzen wurde durchgeführt, indem mit dem Algorithmus BLASTx (Version 2.0.11, Altschul *et al.*, 1997) nach homologen Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken gesucht wurde. 2607 offene

Material

Leserahmen wurden mit dem Programm Gene Finder (Lion Bioscience) vorausgesagt. Für *expectation values* (*E-values*) kleiner 10^{-10} wurde eine eindeutige Annotation vorgenommen, für *E-values* zwischen 10^{-10} und 10^{-4} wurde eine wahrscheinliche Annotation vorgenommen und für *E-values* größer 10^{-4} eine vermutliche Annotation. Auf dem Mikroarray ist ein offener Leserahmen durch 13 *probe pairs* mit speziesspezifischen Oligonukleotiden (25-mer) dargestellt.

2.1.11.2 Weiteres Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Elektroporationsküvetten: <i>Gene Pulser Cuvette</i>	Biorad
Erlenmeyerkolben (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ml)	Schott
Cryobank-System	Mast Diagnostika
Membran für die Northern-Blot-Analyse: <i>Hybond-N+, positively charged nylon transfer membrane</i>	Amersham
Mikrotiterplatte für die <i>real time</i> PCR: <i>Thermo-Fast 96 PCR detection plate</i>	ABgene
PCR-Gefäße (<i>thermo tubes</i> 0,2 ml)	ABgene
Schikanekolben (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ml)	Schott
Sterilfilter (0,2 oder 0,45 μ M)	Sartorius
Whatman-Papier: Filter Paper, Stärke 3	Whatman

2.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Allegra-Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Modell Sorvall Evolution RC
Autoklav	Fedegari Autoklavi spa, Italien Modell FVA13
Beckmann-Photometer	Beckmann, Modell UV-DU 640 Spectrophotometer
<i>Blotter</i>	Biorad, Vacuum Blotter Modell 785
<i>Centrifuge</i>	Eppendorf, Modell Centrifuge 5415
<i>Crosslinker</i>	Biorad, Modell GS Gene Linker UV Chamber
Elektroporationsgerät	Biorad, bestehend aus: Gene Pulser II, Pulse Controller Plus, Capacitance Extender Plus
Gel-Dokumentationsapparatur 1	IDA Image Documentation & Analysis, Fa. Raytest; Bildschirm, Fa. Hitachi; Drucker P91, Fa. Mitsubishi
Gel-Dokumentationsapparatur 2	Bioimaging System, Modell Gene Genius, Fa. Syngene; Digital Graphic Printer, Modell KP- D895, Fa. Sony
Gel-Dokumentationsapparatur 3 für die Northern-Blot-Analyse	Intelligent dark box LAS-1000 IDX, Fa. Fuji
<i>Gene Array Scanner</i>	Agilent
<i>Gene Chip Fluidics Station 400</i>	Affymetrix
<i>Gene Chip Hybridization Oven 640</i>	Affymetrix, Modell H010230
Großer Schüttler	Forma Scientific, Modell 4581 Orbital Shaker
Homogenisator	Omni TH international, Modell FTH220

Gerät	Hersteller
Kleiner Schüttler	Forma Scientific, Modell 4520 Orbital Shaker
<i>Microfuge</i>	Beckmann, Modell <i>Microfuge</i> 18
Photometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Modell 4001/4
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson
<i>Real Time Cyclers</i>	Applied Biosystems, Modell ABI Prism 7000 Sequence Detection System
Schnellkochtopf	SEB, Frankreich, Modell Cocotte minute authentique inox, 18 Liter
Sorvall-Zentrifuge	Fa. Kendro Laboratory Products, Modell Sorvall Evolution RC
<i>Thermo Cyclers</i> (groß)	MJ Research, Inc., Modell PTC-200 mit Alpha Unit Block Assembly for PTC DNA Engine Systems
<i>Thermo Cyclers</i> (klein)	Biozym/MJ Research, Inc., Modell PTC-200

2.1.13 Software

Software	Hersteller / Quelle
<i>Abi Prism 7000 SDS Software</i> , Version 1.1	Applied Biosystems
<i>Affymetrix Microarray Suite (MAS)</i> , Version 5.0	Affymetrix
<i>Aida Image Analyzer</i> , Version 2.11	Raytest
<i>GeneDoc</i> , Version 2.6.003	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html
<i>Primer Express</i> , Version 2.0.0	Applied Biosystems
<i>Vector Expression</i> , Version 3	Informax
<i>Vector NTI</i> , Version 9 und 10	Invitrogen

2.2 Etablierung der simultanen Hybridisierung der cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf den Mikroarray

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Multigenom-Mikroarray der Firma Affymetrix verwendet (2.1.11.1). Für die simultane Hybridisierung der gemischten cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf diesen Mikroarray mussten deshalb die Versuchsbedingungen etabliert werden, da sich die Methoden in dem *Expression Analysis Technical Manual* der Firma Affymetrix auf Mikroarrays beziehen, auf denen die genetische Information von nur einer Spezies dargestellt ist. Die bei der Etablierung eingesetzten Methoden werden nicht im Detail beschrieben, da sie den Methoden in den Abschnitten 2.3 und 2.4 entsprechen. Die Etablierung der Versuchsbedingungen wurde in der Firma Intervet Innovation GmbH von einer zu diesem Zweck gebildeten Arbeitsgruppe durchgeführt. Aus der Gruppe *Target Discovery* waren dies Dr. Nikolas Gunkel (*Manager*), Dr. Joachim Ullrich (*Scientist*), Dr. Volker Spehr (*Scientist*), Kathrin Ullrich (*Technician*), Elena Melnikow (*PhD Student*) und Susanna Röhrig (*PhD Student*), sowie aus der Gruppe *BioChemInformatics* Dr. Hon Tran (*Scientist*).

Allgemeine Qualitätsprüfung der Oligonukleotide

Diese Prüfung sollte zeigen, wieviel Prozent der Oligonukleotide auf dem Mikroarray mit den Genen von *M. haemolytica* und *P. multocida* hybridisieren. Dies wurde sowohl für die genomische DNA als auch für die in cDNA revers transkribierte RNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* bestimmt. Bei der Hybridisierung fragmentierter genomischer DNA auf den Mikroarray wurde erwartet, dass 100% der *probe sets* hybridisieren, bei der Hybridisierung mit cDNA wurde eine geringere Bindung erwartet, da nicht alle Gene gleichzeitig transkribiert werden. Zunächst wurden je 5 µg genomische DNA der Bakterien fragmentiert und biotinyliert und anschließend auf je einen Mikroarray hybridisiert. Das gleiche wurde mit der cDNA beider Bakterien durchgeführt, die jeweils aus der RNA einer logarithmisch wachsenden Kultur von *M. haemolytica* bzw. *P. multocida* hergestellt worden war. Bei Verwendung der genomischen DNA zeigte sich, dass 99,4 % der *probe sets* von *M. haemolytica* mit den Genen von *M. haemolytica* hybridisieren und 95,5 % der *probe sets* von *P. multocida* mit den Genen von *P. multocida*, was einer guten Qualität der *probe sets* entspricht. Bei der Hybridisierung von cDNA auf den Mikroarray hybridisierten 95,9 % der Oligonukleotide von *M. haemolytica* mit der cDNA von *M. haemolytica* und 93,6 % der Oligonukleotide von *P. multocida* mit der cDNA von *P. multocida*.

Speziesspezifische Prüfung der Oligonukleotide

Eine weitere Analyse der oben genannten Hybridisierungen sollte zeigen, ob Kreuzhybridisierungen zwischen der cDNA der Bakterien und den speziesspezifischen *probe sets* ausgeschlossen werden konnten, um die cDNA beider Bakterien gleichzeitig auf den Mikroarray hybridisieren zu können. Für die Analyse der Kreuzhybridisierungen wurde betrachtet, bei wie vielen *probe sets* der einen Spezies die Hybridisierung der DNA der anderen Spezies zu einem Signalwert oberhalb des Grenzwertes von 30 RFU (Empfehlung der Firma Affymetrix) geführt hatte. Die Analyse ergab, dass bei 60 von 4746 *probe sets* Kreuzhybridisierungen auftraten, was 1,26% aller *probe sets* von *M. haemolytica* und *P. multocida* entspricht. Die meisten *probe sets*, bei denen Kreuzhybridisierungen stattfanden, waren von Genen, die für die stark konservierten ribosomalen Proteine kodieren, bei denen keine speziesspezifischen Regionen gefunden werden konnten. Aufgrund der geringen Anzahl an Kreuzhybridisierungen wurden Experimente durchgeführt, bei denen die cDNA beider Bakterien gleichzeitig auf den Mikroarray hybridisiert wurden. Die *probe sets*, bei denen Kreuzhybridisierungen auftraten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Mischung und Konzentration der Nukleinsäuren

Für die simultane Hybridisierung der cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf den Mikroarray wurde überprüft, bei welchem Arbeitsschritt die Mischung der Nukleinsäuren der beiden Bakterien die besten Signalwerte ergab. Zum einen wurde die RNA der beiden Bakterien gemischt und gemeinsam in cDNA umgeschrieben, bevor sie auf den Mikroarray aufgetragen wurde. Im Vergleich dazu wurde die RNA der beiden Bakterien zuerst getrennt voneinander in cDNA umgeschrieben und anschließend gemischt und auf den Mikroarray hybridisiert. Die vergleichende Analyse der Hybridisierungen zeigte keine Unterschiede.

Des Weiteren wurde untersucht, bei welcher Konzentration an cDNA die Signalwerte bezüglich Hintergrund und Intensität am besten waren. Dazu wurde die cDNA beider Bakterien in gleichem Verhältnis aber zwei unterschiedlichen Mengen (5 µg und 2,5 µg in jeweils 100 µl Hybridisierungslösung) auf den Mikroarray hybridisiert. Es zeigte sich, dass bei der Hybridisierung von 2,5 µg cDNA (1,25 µg cDNA pro Bakterium) optimale Signalwerte erhalten wurden, so dass bei Untersuchungen mit biologischer Fragestellung stets diese Menge an cDNA zur Hybridisierung auf den Mikroarray eingesetzt wurde.

Bestimmung der optimalen Wachstumsphase für die Ernte der Bakterien

Mit dieser Versuchsreihe wurde ermittelt, bei welcher optischen Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm, die wenigsten Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase reguliert sind. Bei dieser optischen Dichte sollten die Bakterien dann in nachfolgenden Experimenten geerntet werden. So konnte ausgeschlossen werden, dass Gene aufgrund der Wachstumsphase fälschlicher Weise als differentiell transkribiert gewertet wurden. Dazu wurden die Bakterien in Flüssigkultur herangezogen und von einer OD₅₇₈ von 0,2 bis zu einer OD₅₇₈ von 1,2 zu 5 verschiedenen Zeitpunkten (0, 25, 50, 75 und 100 min) geerntet. Die in cDNA umgeschriebene RNA wurde auf den Mikroarray hybridisiert. Die Analyse ergab, dass die Unterschiede im Transkriptionslevel in der logarithmischen Wachstumsphase am geringsten war, so dass die Bakterien bei nachfolgenden Studien in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₅₇₈ von 0,3 – 0,6 geerntet wurden.

Identifikation der mit dem Mikroarray untersuchbaren Gene

Auf dem Mikroarray waren 2664 *probe sets* für *M. haemolytica* und 2044 *probe sets* für *P. multocida* aufgebracht worden. Diese hohe Anzahl an *probe sets* im Vergleich zu den vorhandenen offenen Leserahmen (2607 bei *M. haemolytica* und 2014 bei *P. multocida* (May *et al.*, 2001)) kam dadurch zustande, dass einige der offenen Leserahmen auf dem Mikroarray durch mehrere *probe sets* dargestellt wurden und nicht alle *probe sets* offene Leserahmen der beiden Bakterien repräsentierten. Einige der *probe sets* stellten ribosomale RNA oder intergenische Regionen dar. Die Darstellung eines offenen Leserahmen durch mehrere *probe sets* wurde von Affymetrix gewählt, wenn das Gen nicht genügend spezifische Regionen besaß, um ein eindeutiges *probe sets* zu erstellen. Die *probe sets*, die das gleiche Gen auf dem Mikroarray darstellen, waren mit unterschiedlichen Algorithmen von Affymetrix erstellt worden. Für *M. haemolytica* traf dies bei 90 Genen zu, von denen 19 durch 3 *probe sets* und 71 durch 2 *probe sets* auf dem Mikroarray dargestellt wurden. Bei *P. multocida* traf dies auf 31 Gene zu, von denen 9 durch 3 *probe sets* und 22 durch 2 *probe sets* repräsentiert wurden. Im Rahmen der Etablierung der Versuchsbedingungen wurde bestimmt, welches von den *probe sets*, die denselben offenen Leserahmen abbilden, in der Auswertung betrachtet werden soll. Es wurde stets das *probe set* ausgewählt, das aufgrund des zur Herstellung verwendeten Algorithmus der Eindeutigkeit am nächsten kam. Die Anzahl an *probe sets*, die ribosomale RNA oder intergenische Regionen darstellen, war deutlich geringer. Bei *M. haemolytica* waren dies 8

probe sets und bei *P. multocida* 4 *probe sets*. Sie wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Einige offene Leserahmen der beiden Bakterien (60 von *M. haemolytica* und 14 von *P. multocida*) konnten nicht auf dem Mikroarray dargestellt werden, da ihre Sequenzen zu unspezifisch waren (Tabelle 29 und Tabelle 30 im Anhang). Zusammenfassend stellte sich heraus, dass mit dem Mikroarray die Transkription von 2547 Genen von *M. haemolytica* (97,7% der 2607 Gene) und von 2000 Genen von *P. multocida* (99,3% der 2014 annotierten Gene von *P. multocida* Pm70, May *et al.*, 2001) untersucht werden konnte.

Bestimmung der homologen Gene auf dem Mikroarray

Für vergleichende Analysen von *M. haemolytica* und *P. multocida* wurde die Homologie-Beziehung der Gene dieser beiden Bakterien aufgrund der Ähnlichkeit ihrer kodierten Proteinsequenzen bestimmt. Dazu wurden die Proteinsequenzen von *M. haemolytica* mit den Proteinsequenzen von *P. multocida* revers verglichen. Ein Homolog-Paar bildeten die beiden Gene, deren kodierte Proteine bei dem wechselseitigen Vergleich der Sequenzen als die Sequenzen mit der größten Ähnlichkeit identifiziert wurden. Für den Vergleich zwischen *M. haemolytica* und *P. multocida* wurde der Algorithmus BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) mit einem E-Value $\leq 0,01$ angewendet. Die Berechnung wurde mit Genlight (Beckstette *et al.*, 2004) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Anzahl der Gene auf dem Mikroarray

	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>
Anzahl der homologen Gene	1424	1424
Anzahl der Gene, die nicht beim anderen Bakterium vorhanden sind	1123	576
Gesamtzahl der Gene	2547	2000

Ablauf der Durchführung von Mikroarray-Studien

Bei der Etablierung der simultanen Hybridisierung der cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf den Multigenom-Mikroarray wurde folgender Ablauf für die Durchführung von Mikroarray-Studien ermittelt:

- Kultivierung der Bakterien, 3x unabhängig voneinander (2.3.2.4)
- Isolierung der RNA (2.4.1)
- Reinigung der RNA von DNA (2.4.2)
- Reinigung der RNA von Proteinen (2.4.3)

Methoden

- Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA (2.4.4)
- Prüfung der Integrität der RNA (2.4.5)
- Mischung der RNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* und cDNA-Synthese (2.4.6)
- Reinigung der cDNA (2.4.8)
- Fragmentierung der cDNA (2.4.9)
- Terminale Biotin-Markierung der cDNA (2.4.10)
- Überprüfung der Biotin-Markierung mittels Gel-Shift-Assay (2.4.11)
- Hybridisierung der markierten cDNA auf den Mikroarray (2.4.12)
- Waschen, Färben und Scannen der Mikroarrays (2.4.13)
- Qualitätsanalyse der Hybridisierung (2.4.14.1)
- Definition der Gene mit veränderter Transkription (2.4.14.2)

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde mit dem Photometer Genesys bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt (OD_{578}) (Maniatis *et al.*, 1982). Ab einer optischen Dichte von 0,4 wurden die Bakterienkulturen verdünnt und der Messwert der verdünnten Probe mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.3.2 Kultivierung von Bakterien

2.3.2.1 Flüssigkultur von *M. haemolytica* und *P. multocida*

M. haemolytica M7/2 wurde in BHI mit 100 µg/ml Streptomycin kultiviert (nach Highlander *et al.*, 2000), *P. multocida* L386 in BHI (nach Paustian *et al.*, 2001). Bei Bedarf wurden weitere Antibiotika zugesetzt. Ein Kügelchen aus einer Kryo-Stamm-Kultur (2.3.2.3) oder eine Impföse mit Bakterien aus einer Glycerin-Stamm-Kultur (2.3.2.3) wurde auf eine Agar-Platte ausgestrichen. Nach 18 h bei 37°C im Brutschrank wurden die Bakterien mit einer Impföse von der Agar-Platte genommen, in 500 µl Medium vollständig und ohne Klümpchen resuspendiert und die benötigte Menge Medium mit einer Bakteriendichte von 0,01 eingestellt. Die Bakterien wurden bei 37°C und 220 rpm kultiviert.

2.3.2.2 Flüssigkultur von *E. coli*

In Anlehnung an Maniatis *et al.* (1982) wurde die benötigte Menge LB-Medium (bei Bedarf mit den benötigten Antibiotika) mit einer Kolonie oder einer kleinen Menge Kultur von *E. coli* angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C und 220 rpm bis zur gewünschten optischen Dichte kultiviert

2.3.2.3 Herstellung von Stamm-Kulturen

Für eine Glycerin-Stamm-Kultur wurde in Anlehnung an Sambrook und Russell (2001) von einer Flüssigkultur mit einer OD₅₇₈ von 0,3 500 µl Bakteriensuspension entnommen. Sie wurden mit 500 µl 50 % Glycerin in Medium gemischt und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Für die Herstellung einer Kryo-Stamm-Kultur wurden in Anlehnung an den Hersteller des Cryobank-Systems (Mast Diagnostika) 2mal 4 ml einer Flüssigkultur bei einer OD₅₇₈ von 0,3 zentrifugiert (1000 g, 5 min, ZT). Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien mit der Flüssigkeit aus dem Kryo-Röhrchen resuspendiert, die resuspendierten Bakterien in das Röhrchen gegeben, 4-5x langsam invertiert, der Überstand verworfen und die Kultur bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2.4 Kultivierung und Ernte von Bakterien für die Mikroarray-Studie

M. haemolytica M7/2 und *P. multocida* L386 wurden wie unter Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben 18 h bei 37°C kultiviert und in 500 µl BHI resuspendiert. Zur Versuchsvorbereitung wurden 50 ml BHI mit einer 10-fach höheren OD an Bakterien eingestellt als sie für den Versuch benötigt wurden, weil geringere Dichten vom verwendeten Photometer nicht mehr korrekt detektiert wurden. Bei *M. haemolytica* betrug die 10-fach höhere OD 0,075 und bei *P. multocida* 0,05. In 315 ml BHI wurden 35 ml der Bakterien mit der 10-fach höheren OD gegeben (Verdünnung 1:10) und die Bakterien lagen damit in der Dichte vor, die für den Versuch benötigt wurde. In 5 250 ml-Erlenmeyer-Kolben wurden aus diesen 350 ml Bakterien-Lösung je 40 ml gegeben. Ein Kolben diente der Messung der OD, ein Kolben als Kontrolle (0 min) und jeweils einer für die Zeitpunkte 15 min, 30 min und 60 min Wachstum unter Eisenmangel.

In einem Vorversuch, in dem die Dichte der Bakterien bei Wachstum unter Eisenmangel beobachtet wurde, wurde ermittelt, bei welcher OD₅₇₈ der Eisenchelator 2, 2'-Dipyridyl zur Erzeugung von Eisenmangel im Medium zugegeben werden musste, damit die Bakterien für die gewünschte Zeit unter Eisenmangel wachsen konnten, bevor sie die für die Ernte benötigte OD₅₇₈ von 0,3 – 0,6 erreicht hatten (Tabelle 5). In der Studie wurde die

Methoden

OD₅₇₈ mit den Bakterien aus dem dafür angeimpften Kolben bestimmt. So wurden die Bakterien stets in der logarithmischen Wachstumsphase bei der gleichen Dichte geerntet (siehe Abschnitt 2.2).

Tabelle 5 OD₅₇₈ der 2, 2'-Dipyridyl-Zugabe

Zeit des Wachstums unter Eisenmangel [min]	60	30	15
OD ₅₇₈ der 2, 2'-Dipyridyl-Zugabe	0,2 – 0,25	0,3 – 0,35	0,35 – 0,4

Es wurden jeweils 40 µl der 2, 2'-Dipyridyl-Stammlösung (500 mM in Ethanol, Aufbewahrung bei 4°C) zugegeben, so dass die Endkonzentration an 2, 2'-Dipyridyl in den Bakterienkulturen 500 µM betrug. Die Endkonzentration von 500 µM 2, 2'-Dipyridyl im Medium wurde aufgrund von Titrationsexperimenten gewählt, die vor Beginn der vorliegenden Arbeit in der Gruppe *Target Discovery* durchgeführt worden waren. Dabei wurde das Wachstum von *M. haemolytica* M7/2 und *P. multocida* L386 in Abhängigkeit der 2, 2'-Dipyridyl-Konzentration bestimmt. Bei 500 µM war es zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung gekommen, die einen Eisenmangel anzeigte (mündliche Kommunikation J. Ullrich). Die für die Bakterien sättigende Konzentration an Eisen im Vollmedium BHI wurde dadurch nachgewiesen, indem Eisen-Citrat mit einer Endkonzentration von 1 mM dem Medium zugesetzt wurde. Dies rief keine Veränderung des Wachstums hervor, während größere Mengen an zugesetztem Eisen-Citrat das Wachstum verringerten. Diese Untersuchung wurde ebenfalls von der Gruppe *Target Discovery* vor Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführt (mündliche Kommunikation J. Ullrich).

Die Kontrolle (0 min) wurde ohne 2, 2'-Dipyridyl kultiviert und ebenfalls bei einer OD₅₇₈ von etwa 0,4 geerntet. Die OD₅₇₈ wurde sowohl bei Zugabe des 2, 2'-Dipyridyls als auch bei der Ernte der Bakterien bestimmt. Für die Ernte wurden 16 ml der Bakterien in ein 50 ml-Gefäß gegeben, mit 5000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Präzipitat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde sehr schnell durchgeführt, damit die bakterielle RNA nicht abgebaut wurde. Für die statistische Analyse (2.4.14) wurden die Bakterien sowohl unter Eisenmangel als auch im Vollmedium BHI (Kontrolle) dreimal unabhängig voneinander angezogen. Die genaue Wachstumszeit der Bakterien unter Eisenmangel, die OD₅₇₈ bei Zugabe von 2, 2'-Dipyridyl sowie die OD₅₇₈ bei der Ernte sind in Tabelle 31 im Anhang aufgelistet.

2.3.3 Berechnung der Verdopplungszeit von Bakterien in Flüssigkultur

Um die Verdopplungszeit von Bakterien in Flüssigkultur bestimmen zu können (Schlegel, 1992), wurde zunächst die optische Dichte der Kultur in zeitlichen Abständen von 20 – 110 min bei 578 nm gemessen (siehe 2.3.1). Mit den Daten wurde eine Wachstumskurve erstellt, in der die Wachstumszeit in Minuten gegen den natürlichen Logarithmus der optischen Dichte bei 578 nm aufgetragen wurde. Die Verdopplungszeit t_d der Bakterien wurde aus der exponentiellen Wachstumsrate μ berechnet, die ein Maß für die Geschwindigkeit des Bakterienwachstums in der exponentiellen Wachstumsphase ist. In der grafischen Darstellung erscheint die exponentielle Wachstumsphase als einziger gerader Abschnitt, anhand dessen die Wachstumsrate μ nach folgender Formel bestimmt wurde:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (T_2 - T_1)$$

wobei T_1 = Zeitpunkt zum Beginn der exponentiellen Phase

T_2 = Zeitpunkt zum Ende der exponentiellen Phase

X_1 = OD_{578} zum Zeitpunkt T_1

X_2 = OD_{578} zum Zeitpunkt T_2

Die Verdopplungszeit t_d wurde aus der Wachstumsrate μ wie folgt berechnet:

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

2.3.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

2.3.4.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* TOP10

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an Sambrook und Russell (2001). *E. coli* TOP10 (2.1.9) wurden auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach 14-18 h wurden mit einer Einzelkolonie 5 ml Medium angeimpft und 14-18 h bei 37°C und 220 rpm kultiviert. 500 ml LB ohne Antibiotikum wurden mit der hergestellten Kultur mit einer OD_{578} von etwa 0,007 angeimpft und bei 37°C mit 220 rpm bis zu einer OD_{578} von 0,6 kultiviert. 400 ml der Kultur wurden entnommen und stets auf Eis gehalten. Zum Waschen wurden die Bakterien 3mal zentrifugiert (3000 g, 15 min, 4°C), der Überstand jeweils verworfen und die Bakterien in kleiner werdendem Volumen eiskaltem autoklaviertem H_2O (200 ml, 50 ml) resuspendiert und in ein 50 ml-Gefäß überführt. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Bakterien in 1,5 ml eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 50 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

2.3.4.2 Herstellung elektrokompetenter *M. haemolytica*

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an Sambrook und Russell (2001). Ein Kügelchen aus einer Kryo-Stamm-Kultur *M. haemolytica* M7/2 wurde auf eine BHI-Streptomycin-Platte ausgestrichen und für 18 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterien wurden mit einer Impföse von der Platte genommen und in 500 µl BHI in einem Eppendorfgefäß resuspendiert. Damit wurden 150 ml BHI mit einer 10-fach höheren OD₅₇₈ eingestellt als es für die Anzucht erforderlich war. Die 10-fach höhere OD₅₇₈ betrug 0,075. Dieser Schritt wurde unternommen, da die benötigte OD₅₇₈ vom Photometer nicht genau gemessen werden konnte. In 450 ml BHI-Streptomycin wurden 50 ml der Bakterien mit der 10-fach höheren OD₅₇₈ gegeben (Verdünnung 1:10). Damit lagen die Bakterien in der benötigten OD₅₇₈ von 0,0075 vor und wurden bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,4 – 0,5 wurden 400 ml der Bakterien entnommen und stets auf Eis gehalten. Zum Waschen wurden die Bakterien 4mal zentrifugiert (6000 g, 20 min, 4°C), der Überstand jeweils verworfen und die Bakterien in kleiner werdendem Volumen Waschlösung (400 ml, 200 ml, 40 ml) resuspendiert und in ein 50 ml-Gefäß überführt. Nach der vierten Zentrifugation wurden die Bakterien in etwa 1 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden sie mit 6000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Bei diesem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet fester und nach dem Resuspendieren in 10%igem Glycerin betrug das Volumen nur noch 1 ml. Anschließend wurden Aliquots von 100 µl erstellt, die bis zur Verwendung am gleichen Tag auf Eis aufbewahrt wurden.

2.3.5 Transformation von DNA in Bakterien mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist ein Verfahren der Transformation von DNA in Bakterien (Chassy *et al.*, 1988). Zur Vorbereitung wurden Elektroporationsküvetten und Medium ohne Antibiotikum auf Eis gestellt. Elektrokompetente *E. coli* (2.3.4.1) wurden auf Eis aufgetaut. 2-5 µg DNA (der Teil eines Ligationsansatzes oder ein Plasmid) wurde in kleinem Volumen (1-2 µl) zugegeben, mit den Bakterien vermischt und bis zu 10 min auf Eis gestellt. Bei *E. coli* wurde die Elektroporation mit 200 Ω, 25 µF und 1,8 – 2,0 kV durchgeführt, bei *M. haemolytica* mit 600 Ω, 25 µF und 2,0 kV. Schnell wurde 1 ml eiskaltes Medium ohne Antibiotikum dazu geben. Anschließend wurden die Bakterien inkubiert. *E. coli* für 1 h bei 37°C und 220 rpm, *M. haemolytica* für 2 h bei 37°C und 100rpm. Nach einer Zentrifugation mit 1000 g für 3-5 min bei ZT wurden 950 µl des Überstands verworfen, das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert und auf Agar-Platten mit

geeigneten Antibiotika ausplattiert. Die Bakterien wurden mindestens 14h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Bei einigen Elektroporationen der Versuche zur Herstellung einer *fur*-Deletionsmutante in *M. haemolytica* war in dem eiskalten Medium, das nach der Elektroporation schnell auf die Bakterien gegeben wurde, 2,2'-Dipyridyl in verschiedenen Konzentrationen enthalten (siehe Ergebnisse Kapitel 3.6.2). Es diente zum Erzeugen von Eisenmangel, da die Möglichkeit bestand, dass die Bakterien bei entstandener Mutante toxische Mengen an Eisen aufnehmen könnten.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Für Arbeiten mit RNA wurden nur RNase-freie Materialien verwendet. Spitzen und Plastikgefäße wurden steril gekauft verwendet und Eppendorfggefäße wurden autoklaviert. Glasgefäße wurden vorbereitet, indem das Gefäß mit RNase-Free eingesprüht, 1 min bei ZT inkubiert und anschließend mit frischem H₂O 3x ausgespült wurde. Flüssigkeiten wurden steril filtriert, indem sie unter der Sterilbank durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm gegeben wurden. Flüssigkeiten wurden zu 0,1 % (v/v) mit DEPC versetzt, über Nacht oder 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Es wurden Handschuhe getragen und Arbeitsflächen mit RNase-Free behandelt.

Bei Experimenten, die der Mikroarray-Analyse folgten, muss folgendes bedacht werden: Bei der Mikroarray-Studie wurde bei der Auswertung der Median aus drei Experimenten verwendet (siehe 2.4.14.2). Bei den Untersuchungen einzelner Gene mit anderen Methoden wie der Northern-Blot-Analyse (2.4.26), der RT-PCR (2.4.27) oder der *real time* PCR (2.4.28) wurde die RNA eines einzelnen Replikats eines Zeitpunktes oder der Kontrolle verwendet. Die RNA für diese Methoden wurde nach Kriterien ausgewählt wie z.B. der noch vorhandenen Menge an RNA oder der Integrität der RNA, so dass bei den Untersuchungen mit anderen Methoden die Abweichungen zwischen Kontrolle und Zeitpunkt z.B. größer oder kleiner sein können als dies bei der Verwendung des Medians der Fall war.

2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Bakterien (Han *et al.*, 1987) erfolgte in Anlehnung an das Protokoll *RNeasy Midi/Maxi Protocol for Isolation of Total RNA from Bacteria* der Firma Qiagen unter Verwendung des *RNeasy Midi Kits*. Die folgenden Angaben sind für ein Bakterien-Pellet aus 16 ml Flüssigkultur und die Zentrifugationen erfolgten im *swing out*-

Methoden

Rotor mit der Allegra-Zentrifuge. Das Bakterien-Pellet wurde in 2 ml Puffer (1 mg Lysozym / ml Puffer TE bei *P. multocida* bzw. 5 mg Lysozym / ml Puffer TE bei *M. haemolytica*) resuspendiert und das 50 ml-Gefäß in der Hand geschüttelt. Für *M. haemolytica* wurde die größere Menge an Lysozym im Puffer eingesetzt, da es sich aufgrund seiner Kapsel mit weniger Lysozym nur schlecht aufschließen lies. Die Inkubation betrug 5 min bei ZT, wobei die Reaktionszeit nicht überschritten wurde. Für die folgenden Schritte wurden die Mengen der Lösungen verwendet, die für eine Maxi-Säule angegeben sind. Die Probe wurde jedoch auf eine Midi-Säule gegeben und diese anschließend nach den Vorschriften für eine Midi-Säule gewaschen. Um die Säule zu trocknen wurde mit 3000-5000 g für 5 min bei ZT zentrifugiert und die Säule im Anschluss auf ein neues Gefäß gestellt. Zur Elution wurde zweimal 100 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und jeweils mit 3000-5000 g für 3 min bei ZT zentrifugiert, wobei die beiden Eluate im gleichen Gefäß aufgefangen wurden. Die RNA wurde bei –80°C aufbewahrt. Anschließend wurde die DNA entfernt (siehe 2.4.2) und die RNA gereinigt (siehe 2.4.3). Konzentration und Reinheit der RNA wurden anschließend photometrisch bestimmt (siehe 2.4.4) und die Integrität der RNA mit einem Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft (siehe 2.4.5). Die Angaben zu Konzentration, Ausbeute und Reinheit der isolierten RNA, die für die Mikroarray-Studie verwendet wurden, sind in Tabelle 31 im Anhang aufgelistet.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebeproben von Rinderlungen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll *RNeasy Midi/Maxi Protocol for Isolation of total RNA from animal tissues* der Firma Qiagen unter Verwendung des *RNeasy Midi Kits*. Mit *M. haemolytica* infiziertes Lungengewebe von Rindern wurde von der Abteilung *Profiling and Product Development* der Firma Intervet Innovation GmbH zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung der RNA wurden sofort nach dem Schlachten kleine Stücke infizierten Lungengewebes in RNAlater nach den Angaben des Herstellers für die dauerhafte Lagerung bei –20°C vorbereitet. Für Kontrollzwecke wurde Lungengewebe eines nicht infizierten Rindes auf gleiche Weise gewonnen. Die in RNAlater bei –20°C aufbewahrten Gewebestücke wurden nach dem Auftauen trocken getupft, mit einer Schere zerkleinert und in einem Röhrchen gewogen. 100 mg Gewebe wurden mit 2 ml Puffer (10 mg Lysozym / ml Puffer TE) homogenisiert, in ein 50 ml-Gefäß überführt und nach spätestens 5 min mit 7,5 ml Puffer RLT, dem Lysis-Puffer des Kits, pro 100 mg Gewebe versetzt und kräftig geschüttelt. Das homogenisierte Gewebe wurde mit 5000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, während das Pellet

verworfen wurde. Zum Überstand erfolgte die Zugabe von 1 Volumen 70% Ethanol, dann wurde das Gefäß kräftig in der Hand geschüttelt, bis keine Präzipitate mehr zu sehen waren und die Flüssigkeit klar war. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde die klare Flüssigkeit aus 100 mg Gewebe wie zur Isolierung von RNA aus Bakterien (siehe oben) eingesetzt.

2.4.2 Reinigung der RNA von DNA mittels DNaseI-Verdau

Um die bakterielle RNA für die Mikroarray-Studie von genomischer DNA zu reinigen wurde sie mit der DNaseI des Kits RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen verdaut. Dazu wurden zunächst 140µl des im Kit enthaltenen Puffers mit 20µl der DNaseI vermischt und dann die gesamte eluierte RNA (200 µl, siehe Abschnitt 2.4.1) zugegeben. Die Inkubation bei ZT betrug 15 min.

2.4.3 Natrium-Acetat-Fällung von Nukleinsäuren

Mit dieser Natrium-Acetat-Fällung nach McCormic (1996) wurden Nukleinsäuren von Proteinen (z.B. nach dem DNaseI-Verdau (Abschnitt 2.4.2)) und anderen Verunreinigungen wie z.B. Salzen befreit, aber sie wurde auch zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäure-Lösungen verwendet. Die Fällung erfolgte mit dem Kit „Pellet Paint Co-Precipitant“ der Firma Novagen nach den Angaben des Herstellers. Die Nukleinsäure-Pellets wurden in MBW gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Für die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren (Sambrook & Russell, 2001) wurde die Absorption der zu untersuchenden Nukleinsäurelösung in einer Quarz-Küvette mit dem Beckmann-Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Nullwert wurden H₂O oder der Puffer gewählt, in dem die Nukleinsäuren gelöst waren. Die Berechnung der Konzentration in µg/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{nukleinsäurespezifischer Faktor } [\mu\text{g/ml}]$$

Es wurden die folgenden nukleinsäurespezifischen Faktoren aufgrund des beschriebenen Zusammenhangs verwendet: Bei 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 40 µg RNA / ml, 50 µg doppelsträngiger DNA / ml oder 33 µg cDNA / ml. Die Reinheit der Lösung ergibt sich aus dem

Quotienten A_{260}/A_{280} . Bei sehr reinen RNA-Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,9 und 2,0; bei sehr reinen DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,95.

2.4.5 Elektrophorese von RNA

Die Elektrophorese nach Lehrach *et al.* (1977) wurde durchgeführt, um die Integrität der isolierten RNA zu prüfen, d.h. um festzustellen, ob die RNA unverdaut vorlag. Im denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel wurden die mRNA und die verschiedenen ribosomalen RNAs ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 2 µg der isolierten RNA verwendet. Diese Elektrophorese wurde auch bei der Northern-Blot-Analyse verwendet (2.4.26). Zur Vorbereitung wurden vor dem Auftragen auf das Gel für eine Spur mindestens 2 µg der zu trennenden RNA bzw. 2 µg RNA-Marker mit RNase-freiem Wasser aus dem RNeasy Midi Kit der Firma Qiagen auf ein Mindest-Volumen von 3 µl aufgefüllt und mit 3 Volumen RNA-Probenpuffer sowie 0,3 Volumen Ethidiumbromid (1:10 mit H₂O verdünnt) vermischt und zum Denaturieren für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1 min auf Eis gekühlt und mit 0,1 Volumen RNA-Farbstoff versetzt. Der gesamte Ansatz wurde in eine Geltasche aufgetragen. Für das 1,2 %ige Gel wurde in eine 500 ml Glasflasche (RNase-frei) 1,2 g Agarose eingewogen, 10 ml 10x MOPS-Puffer zugegeben und das Gewicht auf 100 g mit DEPC-H₂O eingestellt. Die Flasche wurde 2 min in der Mikrowelle erhitzt, geschüttelt und nochmals 1 min erhitzt, so dass sich die Agarose beim Kochen Schlieren-frei gelöst hatte. Auf der Waage wurde das Gewicht erneut mit DEPC-H₂O auf 100 g eingestellt und die Flasche auf 65°C abgekühlt. Anschließend wurden 1,8 ml 37% Formaldehyd zugegeben und das noch flüssige Gel in eine RNase-freie Gelkammer mit entsprechendem Kamm überführt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm heraus gezogen und das Gel mit 1x MOPS-Puffer, der als Laufpuffer diente, überschichtet. Die Laufbedingungen waren 100-120 V konstant bei ZT für 1-2 h. Aufnahmen von den Gelen wurden mit der Dokumentationsapparatur 1 oder 2 gemacht.

2.4.6 cDNA-Synthese für die Mikroarray-Studie

Die cDNA-Synthese für die Mikroarray-Studie wurde mit dem Kit *SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase* der Firma Invitrogen (siehe 2.1.7) durchgeführt. 10 µg RNA von *M. haemolytica* M7/2 und 10 µg RNA von *P. multocida* L386 (2.4.1) von einem Zeitpunkt (15, 30 bzw. 60 min Wachstum unter Eisenmangel) oder einer Kontrolle (Wachstum ohne Eisenchelator) wurden gemischt (Tabelle 32 im Anhang). Die 20 µg gemischte RNA wurde gemeinsam in cDNA umgeschrieben, da die cDNA beider Pathogene gemeinsam

auf den Mikroarray hybridisiert wurde. Es wurden mindestens 2,9 µg cDNA benötigt: jeweils 0,2 µg für die unmarkierte und die markierte Probe im Gel-Shift-Assay (siehe 2.4.11) und 2,5 µg für die Hybridisierung (siehe 2.4.12).

Für die Hybridisierung der Primer wurden 10 µg RNA von *M. haemolytica* und 10 µg RNA von *P. multocida* mit *Nuclease Free Water* auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt und mit 20 µl Random Primers (3 µg/µl, verdünnt auf 75 ng/µl) gemischt. Der 60 µl-Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, dann für 10 min bei 25°C und anschließend für etwa 1 min auf Eis gestellt.

Für die cDNA-Synthese wurde folgender *premix* angesetzt: 24 µl 5x *1st Strand Buffer*, 12 µl 100 mM DTT, 6 µl 10 mM dNTPs, 3 µl *SUPERase In* (20 U/µl) und 15 µl *SuperScript II* wurden gemischt und die 60 µl *premix* in der *Microfuge* mit 14000 rpm für 1 min bei ZT zentrifugiert.

Die 60 µl des Ansatzes der Primer-Hybridisierung wurden mit den 60 µl des *premix* für die cDNA-Synthese vermischt und die 120 µl Gesamtvolumen wie folgt in einem der *Thermo Cycler* inkubiert: 10 min bei 25°C, 60 min bei 37°C, 60 min bei 42°C, 10 min bei 70°C zur Inaktivierung der SuperScript II und 4°C bis zur Entnahme aus dem Gerät. Anschließend wurden 40 µl 1N NaOH zugegeben und für 30 min bei 65°C zur Beseitigung der RNA inkubiert. Zum Neutralisieren wurden im Anschluss 40 µl 1N HCl zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 200µl vorhanden war. Die nachfolgende Reinigung der cDNA wurde wie unter 2.4.8 beschrieben durchgeführt, wobei die cDNA mit 42 µl Elutionspuffer EB eluiert wurde und das Eluat 40 µl betrug. Die photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit der cDNA wurde mit folgenden Abweichungen nach 2.4.4 durchgeführt: Die cDNA wurde 1:10 in H₂O verdünnt (4 µl cDNA + 36 µl H₂O) und ein entsprechender Nullwert verwendet (4 µl Puffer EB + 36 µl H₂O). In 0 im Anhang sind die Ausbeute und Reinheit der cDNA und die Nummer des Mikroarrays, auf den die cDNA hybridisiert wurde, aufgelistet.

2.4.7 cDNA-Synthese für RT-PCR und *real time* PCR

Als *template* für die cDNA-Synthese für die RT-PCR (2.4.27) wurde die RNA aus Gewebeproben von Rinderlungen verwendet (2.4.1). Als *template* für die cDNA-Synthese für die *real time* PCR (2.4.28) wurde dieselbe RNA verwendet, die auch für die Mikroarray-Studie verwendet wurde (2.4.1). Es wurden die *M. haemolytica*-RNA-Proben 150 (0 min), 151 (15 min), 152 (30 min) und 153 (60 min) verwendet (siehe Tabelle 31 im Anhang). Zunächst wurde die RNA gereinigt und konzentriert. Zur Reinigung von

genomischer DNA wurde die RNA mit der DNaseI aus dem Kit *Deoxyribonuclease I* der Firma Invitrogen nach den Angaben des Herstellers verdaut. Nach dem Verdau wurde die RNA mittels Natrium-Acetat-Fällung (siehe 2.4.3) konzentriert, weil sie für die Reverse Transkription in einer Konzentration von mindestens 1,25 µg/µl benötigt wurde. Die RNA-Präzipitate wurden in einem geeigneten Volumen MBW aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Für diese cDNA-Synthese wurden die Komponenten des Kits *Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR* der Firma Invitrogen (2.1.7) verwendet. Für 5 µg RNA wurde ein Denaturierungsansatz in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vorbereitet: 4 µl RNA, 2,5 µl *Random Hexamers* (50 ng/µl), 1 µl 10 mM *dNTP mix* (jeweils 10 mM) und 2,5 µl *DEPC-treated water* wurden gemischt. Für die Negativ-Kontrolle wurde statt der RNA *DEPC-treated water* des Kits verwendet. Die 10 µl Denaturierungsansatz wurden für 5 min bei 65°C inkubiert, bevor sie für mindestens 1 min auf Eis abkühlten und in PCR-Gefäße transferiert wurden. Der *premix* für die Reaktion (für 5 µg RNA) wurde wie folgt zusammengesetzt: 2 µl 10x RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1M DTT und 1 µl *RNase Out*.

Die 10 µl Denaturierungsansatz und die 9 µl *premix* für die Reaktion wurden in einem PCR-Gefäß zum Reaktionsansatz gemischt. Die Ansätze wurden für 2 min bei 25°C zur Hybridisierung der *Random Hexamers* inkubiert, bevor auf Eis die Zugabe von 1 µl Superscript II RT zu jedem Ansatz erfolgte. In einem *Thermo Cycler* wurden die Ansätze für 10 min bei 25°C für die ersten Syntheseschritte inkubiert, für die Synthese für 50 min bei 42°C und zur Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70°C, dann kühlte der *Thermo Cycler* auf 4°C ab. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl RNase H zugegeben, die in 20 min bei 37°C den Abbau der RNA katalysierte. Abschließend kühlte der *Thermo Cycler* wieder auf 4°C. Nach Abschluss der Synthese wurde die cDNA mittels Natrium-Acetat-Fällung (siehe 2.4.3) gereinigt sowie die Konzentration und die Reinheit der cDNA photometrisch bestimmt (siehe 2.4.4).

2.4.8 Reinigung von cDNA und PCR-Produkten

Die Reinigung von synthetisierter cDNA für die Mikroarray-Studie (2.4.6) sowie von PCR-Produkten direkt aus einem PCR-Reaktionsansatz (2.4.19) erfolgte mit dem Kit *Qiaquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen nach dem Protokoll *QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge* des Herstellers. Eluiert wurde je nach Bedarf mit MBW oder Puffer EB und die Eluate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.9 Fragmentierung von cDNA mittels DNaseI-Verdau

Nach der Konzentrationsbestimmung (2.4.4) der für die Mikroarray-Studie gereinigten cDNA (2.4.8) waren noch 36 µl der cDNA vorhanden, die komplett in die Fragmentierung eingesetzt wurden. Die cDNA wurde mit der mit DNaseI der Firma Amersham nach den Vorgaben des Herstellers fragmentiert, wobei Fragmente von etwa 300 b entstanden. 36 µl cDNA wurden mit 5 µl 10x *One-Phor-All Buffer Plus* und 0,6 Einheiten (*units*) DNase I (Amersham) pro 1 µg cDNA gemischt und das Volumen mit *Nuclease Free Water* auf 50 µl aufgefüllt. Die Inkubation fand für 10 min bei 37°C statt, anschließend wurde die DNase I für 10 min bei 98°C inaktiviert und der Ansatz auf Eis gestellt. Von jeder Probe wurden 0,2 µg cDNA für den Gel-Shift-Assay (siehe Abschnitt 2.4.11) abgenommen und das entnommene Volumen sofort mit *Nuclease Free Water* nachgefüllt.

2.4.10 Terminale Biotin-Markierung von cDNA

Die für die Mikroarray-Studie fragmentierte cDNA (siehe Abschnitt 2.4.9) (ca. 5 µg in 50 µl) wurde komplett in die 3'-Endmarkierung eingesetzt, die mit dem *Bioarray Terminal Labeling Kit* der Firma Enzo und seinen Komponenten wie folgt durchgeführt wurde: 20 µl 5x Reaktionspuffer, 10 µl 10x CoCl₂, 1 µl 100x Biotin-ddUTP, 2 µl 50x *Terminal Deoxynucleotide Transferase* und 15 µl *Nuclease Free Water* wurden gemischt und mit den 50 µl der fragmentierten cDNA versetzt, so dass ein Reaktionsvolumen von 98 µl vorlag. Die Inkubation fand für 60 min bei 37°C statt und wurde durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Von jeder Probe wurden 0,2 µg cDNA für den Gel-Shift-Assay (2.4.11) abgenommen und das entnommene Volumen sofort mit *Nuclease Free Water* nachgefüllt. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.11 Überprüfung der Biotin-Markierung von cDNA mittels Gel-Shift-Assay

Zur Überprüfung der 3'-Endmarkierung der fragmentierten cDNA wurden unmarkierte (2.4.9) und markierte cDNA (2.4.10) nebeneinander auf ein Gel aufgetragen, wobei der Größenunterschied nach dem Anfärben sichtbar wurde. Der Gel-Shift-Assay wurde in Anlehnung an das *Expression Analysis Technical Manual* der Firma Affymetrix durchgeführt. Für die 6%ige Polyacrylamid-Gelmatrix wurden 7,5 ml H₂O 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 500 µl TBE-Puffer (10x), 200 µl 10% APS und 8 µl TEMED in ein 15 ml-Röhrchen gegeben, 10x langsam invertiert und in die Gelkammer gegossen. Dann wurde der Kamm eingesteckt und das Gel bei ZT ausgehärtet. Anschließend wurde der Kamm heraus gezogen und das Gel mit 0,5% TBE-Puffer, der als Laufpuffer diente,

Methoden

überschichtet. Die Proben (je 0,2 µg unmarkierte und markierte cDNA (siehe 2.4.9 und 2.4.10), wurden mit *Nuclease Free Water* auf ein Volumen von etwa 7 µl aufgefüllt und mit 5 µl Neutravidin-Stammlösung (2 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 200 mM NaCl) für 5 min bei ZT inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 5x *Sucrose Gel Loading Dye* zugegeben, so dass ein Volumen von 15 µl vorlag. Zu 2 µl DNA-Marker wurden 3 µl 5x *Sucrose Gel Loading Dye* und 10 µl H₂O gegeben, so dass auch er in einem Volumen von 15 µl vorlag. Der Marker und die Proben wurden jeweils komplett in eine Spur aufgetragen. In die nicht belegten Spuren wurden 15 µl 1x *Sucrose Gel Loading Dye* gegeben. Die Elektrophorese wurde bei Verwendung von einem Gel für etwa 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt; bei Verwendung von 2 Gelen für etwa 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Zum Färben der Gele wurden sie in 40 ml TBE-Puffer (1x) mit 4 µl SYBR Gold für 20 min bei ZT im Dunkeln geschwenkt. Eine Aufnahme des Gels wurde mit der Dokumentationsapparatur 1 gemacht.

2.4.12 Hybridisierung der markierten cDNA auf den Mikroarray

In die Hybridisierung nach dem *Expression Analysis Technical Manual* von Affymetrix wurden 2,5 µg markierte cDNA eingesetzt. Da die RNA der beiden Bakterien gemeinsam verarbeitet wurde, waren so von jedem Bakterium 1,25 µg cDNA enthalten. Das Volumen der cDNA wurde für die Hybridisierung mit MBW auf 100 µl aufgefüllt. Die benötigten Lösungen wurden stets frisch angesetzt. Die Zentrifugationsschritte dienten dazu eventuell vorhandene Schwebeteilchen aus den Lösungen zu entfernen. Zuerst wurde die Prähybridisierungslösung aus 100 µl 2x MES Hybridisierungspuffer und 100 µl MBW in der *Microfuge* mit 18000 g für 1 min bei RT zentrifugiert und auf den Mikroarray gegeben. Der Mikroarray wurde für 10 min bei 45°C mit 60 rpm im *Gene Chip Hybridization Oven* inkubiert. In dieser Zeit wurde die Hybridisierungslösung frisch angesetzt. 100 µl 2x MES Hybridisierungspuffer, 3,3 µl *Control Oligo B2* (3 nM), 2 µl *Herring Sperm DNA* (10 mg/ml), 2 µl BSA (50 mg/ml) und 100 µl markierte cDNA wurden gemischt. Die Hybridisierungslösung wurde für 5 min bei 99°C erhitzt, um die Doppelstränge aufzuspalten und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor sie 5 min bei 45°C vortemperiert und mit 18000 g für 5 min bei ZT in der *Microfuge* zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurden die 200 µl Prähybridisierungslösung vom Mikroarray genommen und durch die 200 µl Hybridisierungslösung ersetzt. Die Inkubation fand im *Gene Chip Hybridization Oven* mit 60 rpm für 16 h bei 45°C statt.

2.4.13 Waschen, Färben und Scannen der Mikroarrays

Die hier beschriebenen Schritte folgten dem *Expression Analysis Technical Manual* von Affymetrix. Es wurden drei Lösungen frisch angesetzt, deren Volumen für einen Mikroarray ausreichte. Die Streptavidin-Lösung bestand aus 300 µl 2x MES Hybridisierungspuffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl Streptavidin (1 mg/ml PBS) und 270 µl MBW. Die Antikörper-Lösung wurde aus 300 µl 2x MES Hybridisierungspuffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl *Goat IgG* (10 mg/ml PBS), 6 µl *Biotinylated Antibody* (0,5 mg/ml) und 264 µl MBW zusammengesetzt. Für die Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung wurden 300 µl 2x MES Hybridisierungspuffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1mg/ml) und 270 µl MWB zusammengegeben. Die Lösungen wurden in 15 ml Röhrchen angesetzt und 10x langsam invertiert. Anschließend wurden sie in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben und mit 18000 g für 5 min bei ZT in der *Microfuge* zentrifugiert. Danach wurden je 600 µl einer Lösung zum Schutz vor Licht in ein dunkelbraunes 1,5-ml-Eppendorfgefäß gegeben. Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei ZT aufbewahrt. Das BSA in den Lösungen diente dem Absättigen unspezifischer Bindungen. Bei der ersten Färbung mit der Streptavidin-Lösung bindet das Streptavidin an die biotinylierten cDNA-Fragmente. Bei der zweiten Färbung mit der Antikörper-Lösung bindet der biotinylierte Antikörper an das Streptavidin und der Goat IgG sättigt unspezifische Bindungen ab. Bei der dritten Färbung mit der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung bindet das Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) an den biotinylierten Antikörper.

Das Färben und Waschen der Mikroarrays erfolgte in der *Gene Chip Fluidics Station* und wurde über die Software MAS gesteuert. Zur Vorbereitung wurde die *Fluidics Station* vor jedem Einsatz 3x mit dem Programm *Prime* unter Verwendung der Waschpuffer A (ZT) und Waschpuffer B (ZT) sowie MBW gewaschen. Es konnten bis zu 4 Mikroarrays gleichzeitig gewaschen und gefärbt werden. Die Mikroarrays wurden von dem *Gene Chip Hybridization Oven* in die startbereite *Fluidics Station* überführt und das Programm „ProkGE-WS2v3“ gestartet. Das Programm lief etwa 1,5h und beinhaltete die folgenden Abläufe: 10x Waschen mit Waschpuffer A bei 25°C, 4x Waschen mit Waschpuffer B bei 45°C, die erste Färbung mit der Streptavidin-Lösung für 10 min bei 25°C, 10x Waschen mit Waschpuffer A bei 30°C, die zweite Färbung mit der Antikörper-Lösung für 10 min bei 25°C, die dritte Färbung mit der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung für 10 min bei 25°C und zum Abschluss 15x Waschen mit Waschpuffer A bei 30°C.

Nach Programmende in der *Gene Chip Fluidics Station* wurden die Mikroarrays bei ZT im Dunkeln aufbewahrt und nacheinander gescannt. Dazu wurden zuvor eventuell

vorhandene Luftblasen aus dem Mikroarray entfernt und der Mikroarray außen mit einem fusselfreien Tuch abgewischt, damit keine Flecken das Scannen verhindern konnten. Der *Gene Array Scanner* wurde ebenfalls über die Software MAS gesteuert. Beim Scannen wurde das Phycoerythrin von einem Laser bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenzsignale bei 570 nm detektiert. Das Programm veranlasste, dass jeder Mikroarray zweimal gescannt und die gemessenen Signalwerte von der Software gemittelt wurden; dies erhöhte die Sensitivität und verringerte die Hintergrundsignale.

2.4.14 Auswertung der Mikroarray-Studie

2.4.14.1 Qualitätsanalyse der Hybridisierungen und Replikate

Beschreibungen und Erläuterungen zu diesen von Affymetrix empfohlenen Punkten der Qualitätsprüfung befinden sich im *Data Analysis Fundamentals Manual* und im *Affymetrix Microarray Suite User Guide*, Version 5.0. Sie betreffen sowohl die qualitative Prüfung der Hybridisierung von cDNA an die Oligonukleotide der einzelnen Mikroarrays als auch die Prüfungen, ob sich die Hybridisierungen ausreichend wenig voneinander unterscheiden, um als verwertbare Replikate eingestuft werden zu können. Von der Kontrolle (Wachstum der Bakterien im Vollmedium BHI) und den 3 Zeitpunkten mit Wachstum unter Eisenmangel wurden jeweils 3 Replikate mit hoher Qualität benötigt, um die statistische Analyse durchführen zu können. Bestand ein gescannter Mikroarray die Qualitätsanalyse nicht, wurden die Bakterien erneut kultiviert und ihre in cDNA revers transkribierte RNA auf einen weiteren Mikroarray hybridisiert.

Die mit der Software MAS ermittelten Signalwerte (*expression values*) der einzelnen Mikroarrays wurden zunächst einer Qualitätsanalyse unterzogen. Für die untersuchten Qualitätsindikatoren (Tabelle 33 im Anhang) wurden Grenzen gesetzt, die bei keinem Mikroarray überschritten werden durften. Die in Tabelle 33 im Anhang aufgelisteten Werte, die sich für die verwendeten Mikroarrays ergaben, liegen alle innerhalb der festgesetzten Grenzen.

Die vergleichende Analyse der Replikate wurde in Zusammenarbeit mit H. Tran durchgeführt. Dabei wurde überprüft, bei wie viel Prozent der *probe sets* die Signalwerte um mehr als das Doppelte voneinander abwichen. Der Empfehlung von Affymetrix folgend wurden nur solche Replikate in die Auswertung einbezogen, bei denen beim paarweisen Vergleich nicht mehr als 2% der *probe sets* einen mehr als 2fachen Unterschied zeigten. Bevor die Veränderung der Signalwerte zweier Mikroarrays berechnet wurde,

wurden die *probe sets* ausgeschlossen, bei denen bei beiden Mikroarrays die Signalwerte unter 30 lagen. Der Signalwert von 30 hatte sich nach mündlichen Informationen der Firma Affymetrix als ein empirisch ermittelter Schwellenwert für die Transkription herausgestellt. Replikate mit einem größeren Anteil an *probe sets* mit mehr als 2facher Abweichung in den Signalwerten wurden nicht verwendet und die Bakterien unter den entsprechenden Bedingungen erneut kultiviert. Die berechneten Werte in Tabelle 34 im Anhang zeigen, dass der Anteil der Gene mit einer mehr als 2fachen Veränderung in den Signalwerten immer deutlich unter 2 % lag, sogar nur einmal 1 % überschritt. Zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten zwischen den Mikroarray-Replikaten wurden die Signalwerte der einzelnen *probe sets* verwendet. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Replikaten lagen zwischen 0,96 und 0,99 (Tabelle 34 im Anhang) und lagen damit über dem geforderten Faktor von 0,92.

2.4.14.2 Definition der Gene mit veränderter Transkription

Zur Definition der Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida*, die bei den verschiedenen Zeiten nach Wachstum unter Eisenmangel im Vergleich zur Kontrolle eine veränderte Transkription hatten, wurden Grenzwerte festgelegt. Für jedes *probe set* waren in der gesamten Studie 12 Signalwerte vorhanden, die aus den drei Wiederholungen für die Kontrolle und für drei Zeitpunkte unter Eisenmangel (15, 30 und 60 min) stammten.

Für die Berechnung der signifikanten Transkriptionsänderung der Gene bei Wachstum unter Eisenmangel wurden die von der Software MAS normalisierten Signalwerte in die Software *Vector Expression* geladen. Dort wurde der Mann-Whitney-Algorithmus für die Berechnung der Signifikanz verwendet, da die Signalwerte nicht normalverteilt sind. Der Mann-Whitney-Algorithmus verwendet den Median und berücksichtigt die Standardabweichung der Einzelmesswerte. So wurden über einen Gruppenvergleich die Signalwerte von den drei Mikroarrays eines Zeitpunkts gegen die Signalwerte der drei Mikroarrays der Kontrolle miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei 0,1.

Für die weitere Analyse wurden die von der Software MAS normalisierten Signalwerte in die Software Excel geladen, wobei auch die Information der signifikanten Transkriptionsänderung aufgenommen wurde. Es wurden die Gene als nicht transkribiert gekennzeichnet und von der Auswertung ausgeschlossen, bei denen die Signalwerte eines *probe sets* bei allen 12 Mikroarrays unter 31 lagen, da ein Signalwert von unter 31 als unterhalb der Nachweisgrenze angesehen wurde (siehe 2.4.14.1). Für die Identifizierung der Gene mit veränderter Transkription wurde der Median der drei Signalwerte der *probe*

sets aus den 3 Replikaten verwendet, weil der Median im Gegensatz zum Mittelwert robuster gegenüber Ausreißern ist. Aus den verbleibenden Genen wurden schließlich die Gene mit veränderter Transkription herausgefiltert. Bei ihnen unterschied sich bei mindestens einem Zeitpunkt der Median der Signalwerte der *probe sets* um einen Faktor 2 von dem Median der gleichen *probe sets* der Kontrolle.

2.4.15 Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Chen & Kou (1993). 7 ml einer Flüssigkultur (siehe 2.3.2.1) mit einer OD_{578} von 0,5 – 0,7 wurden mit 2100 g für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für die Isolierung wurde das Bakterien-Pellet in 200 µl Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 min bei ZT inkubiert. Anschließend wurden 66 µl (0,33 Volumen) 5 M NaCl zugegeben und stark gemixt, bevor mit 16000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und das Pellet verworfen. Zum Überstand wurde 1 µl (ca. 0,004 Vol) RNaseA (100 mg/ml) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 266 µl (gleiches Volumen) Chloroform zugegeben und durch 50x invertieren vorsichtig gemischt. Es wurde mit 18000 g für 3 min bei ZT zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, während der Rest verworfen wurde. Zur wässrigen Phase wurden 266 µl (gleiches Volumen) Isopropanol zugegeben und für 10 min bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 16000 g für 15 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 100 µl 70% Ethanol durch eine Zentrifugation bei 16000 g für 5 min bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Pellet an der Luft oder in der Speed Vac getrocknet und je nach Weiterverwendung in 60 µl Elutionspuffer EB, Puffer TE oder MBW gelöst. Die Konzentrationsbestimmung (2.4.4) wurde mit einer Verdünnung von 1:50 durchgeführt und die genomische DNA bei 4°C aufbewahrt.

2.4.16 Plasmid-Präparationen

Die Präparation von Plasmiden aus kleinen Volumen von Bakterien-Kulturen (Plasmid-Mini-Präparation) wurde mit dem Kit *Qiaprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen nach dem Protokoll *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol using a microcentrifuge* des Herstellers durchgeführt.. Die Plasmide wurden bei -20°C aufbewahrt.

Die Präparation von Plasmiden in größerer Menge (Plasmid-Maxi-Präparation) wurde z.B. für verschiedene Schritte einer Klonierungsstrategie benötigt oder für Plasmide, die

zur Erzeugung einer Mutation mittels Elektroporation (2.3.5) in Bakterien transformiert werden sollte. Dazu wurde der Kit *Qiafilter Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen nach dem Protokoll *Plasmid or Cosmid DNA Purification using Qiafilter Plasmid Midi and Maxi Kits* des Herstellers verwendet. Bei der Präparation von Plasmiden mit mittlerer oder hoher Kopienzahl (basierend auf dem Vektor pMaha-016a) wurden 250 ml Übernacht-Kultur verwendet, bei der Präparation von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl (*low copy*, basierend auf dem Vektor pMaha-121) wurden 500 ml Übernacht-Kultur eingesetzt. Bei Verwendung der Plasmide für Elektroporationen wurden sie in MBW resuspendiert, damit der Salzgehalt so gering wie möglich blieb. Aufbewahrt wurden die Plasmide bei -20°C .

2.4.17 Methylierung von Plasmiden zur Elektroporation in *M. haemolytica*

Um die Transformationseffizienz der aus *E. coli* isolierten Plasmide in elektrokompetente *M. haemolytica* zu erhöhen, wurden einige Plasmide nach dem Standardverfahren der Gruppe *Target Discovery* mit einem cytosolischen Extrakt aus *M. haemolytica* methyliert. Die Anzucht von *M. haemolytica* erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben, doch wurden hier 400 ml BHI-Streptomycin inokuliert und die Bakterien mit 5000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das bakterielle Pellet wurde in 5fachem Volumen Extraktionspuffer mit 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail pro 10 ml Puffer resuspendiert und in ein 50 ml-Gefäß überführt. Mit dem Ultraschallstab wurden die Bakterien 4mal für 10 sec aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit 15000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce nach den Angaben des Herstellers. Für die Methylierung der Plasmide wurde 1 μg DNA mit etwa 50 μg Proteinextrakt und einer Endkonzentration von 200 μM S-Adenosyl-Methionin für 1 h bei 37°C inkubiert. Für die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion der methylierten DNA wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, kräftig gemischt und mit 16000 g für 3 min bei ZT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem oben verwendeten Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gemischt und abzentrifugiert. Nach dem dritten Mal wurde die obere Phase zweimal mit dem oben verwendeten Volumen Chloroform kräftig gemischt und mit 16000 g für 3 min bei ZT zentrifugiert. Im Anschluss

folgte eine Natrium-Acetat-Fällung der DNA (siehe 2.4.3). Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen MBW vollständig gelöst und zur Elektroporation verwendet.

2.4.18 Denaturierung von DNA zur Elektroporation in *M. haemolytica*

2 – 10 µg Plasmid oder PCR-Produkt wurden einer Natrium-Acetat-Fällung unterzogen (siehe 2.4.3) und das Pellet in einem Gemisch aus 0,2 M NaOH und 0,2 M EDTA (1:1) mit 10 µl pro 1 µg DNA gelöst. Anschließend wurde es für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut einer Natrium-Acetat-Fällung unterzogen. Das Pellet wurde in einem geringen Volumen (ca. 5 µl) MBW gelöst und in die Elektroporation eingesetzt.

2.4.19 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Anreicherung (Amplifizierung) von Nukleinsäure-Abschnitten definierter Länge und Sequenz wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Bei Verwendung von genomischer DNA als *template* wurde die DNA in einer Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt; bei Verwendung von Plasmiden als *template* wurden 10 ng des Plasmids eingesetzt. Neue Primer wurden in Kontrollen daraufhin getestet, ob Primer-Dimere amplifiziert wurden oder ein Primer mehrmals binden konnte und nicht ausschließlich das gewünschte PCR-Produkt aus beiden Primern entstand. Dazu wurde in Kontrollansätzen nur ein Primer in die Reaktion eingesetzt. Stets wurde eine Kontrolle ohne *template* mitgeführt, um die Reinheit der Reaktionskomponenten zu überprüfen. Die Temperatur für das Anlagern (*annealing*) der Primer richtete sich nach deren Schmelztemperatur (etwa 5°C darunter). Die Zeit für die Verlängerung (Elongation) richtete sich nach der Länge des erwarteten PCR-Produkts. Für 1000 b Verlängerung wurden 60 sec Elongationszeit verwendet. Die Programme in einem der beiden *Thermo Cyclers* durchliefen 30, 35 oder 40 Zyklen. Diente die PCR zur Kontrolle, wurde das Enzym Platinum-Taq der Firma Invitrogen mit den entsprechenden Komponenten des Kits eingesetzt. Wurde ein PCR-Produkt erstellt, um weiter verwendet zu werden, z.B. für eine Ligation (2.4.24), wurde mit dem Enzym HiFi-Taq der Firma Invitrogen mit den entsprechenden Komponenten des Kits gearbeitet. PCR-Produkte wurden bei –20°C aufbewahrt. Die Reaktionsansätze wurden in Anlehnung an die Angaben der Hersteller erstellt. Die Programme im *Thermo Cycler* entsprachen denen in Tabelle 6.

Tabelle 6 Programmablauf der PCR in einem *Thermo Cycler*

Programmschritt	Temperatur [°C]*	Zeit [sec]	Anmerkung
1	94	120	lange Denaturierung der cDNA und Aktivierung des Enzyms
2	94	30	Denaturierung
3	55 [#]	30	Anlagerung / Annealing
4	72 bzw. 68	60 [#]	Verlängerung / Elongation
5	(gehe zu Schritt 2 für 35 [#] mal)		Anzahl der Zyklen
6	72 bzw. 68	600	lange Elongation zum Abschluss begonnener Verlängerungen
7	4	anhaltend	Stopp der Reaktionszeit

*Die Elongation bei Verwendung des Enzyms Platinum-Taq fand bei einer Temperatur von 72°C statt, während die Temperatur bei Verwendung des Enzyms HiFi-Taq 68°C betrug.

[#]Werte wurden variabel gewählt (siehe oben im Text)

Wenn in Bakterien-Kulturen nach einem bestimmten Abschnitt DNA gesucht wurde, wurde als *template* nicht die genomische DNA oder ein Plasmid eingesetzt, sondern eine geringe Menge der Bakterien-Kultur. Dieser Ansatz wurde als Kultur-PCR bezeichnet. Eingesetzt wurde diese Methode z.B. beim Nachweis auf eine Mutante bei den Versuchen zum Herstellen einer Mutante in *M. haemolytica*. Dazu wurde das Enzym Platinum-Taq verwendet und als *template* 10% (v/v) der Bakterien-Kultur eingesetzt. Der übrige Reaktionsansatz entsprach dem oben genannten und die Anzahl der Zyklen betrug stets 40.

2.4.20 Elektrophorese von DNA

1%ige DNA-Agarose-Gele (Sambrook & Russel, 2001) wurden sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt. Die Gelmatrix wurde hergestellt, indem für ein Gel 0,5 g Agarose in einer 500 ml-Glasflasche eingewogen und mit 50 ml TBE-Puffer (1x) vermischt wurden. Die Flasche wurde gewogen und für 2 min in der Mikrowelle erhitzt, geschüttelt und nochmals 1 min in der Mikrowelle erhitzt, so dass sich die Agarose beim Kochen Schlieren-frei gelöst hatte. Das beim Aufkochen verdampfte Wasser wurde auf der Waage mit H₂O aufgefüllt. Nach dem Abkühlen der Gelmatrix auf etwa 45°C wurde sie in ein 50 ml-Gefäß überführt und 2 µl Ethidiumbromid (1:10 mit H₂O verdünnt) dazu gemischt, bevor sie in eine Gelkammer mit gewünschtem Kamm gegossen wurde. Nach dem Aushärten wurde der Kamm heraus gezogen und das Gel mit dem als Laufpuffer TBE (1x) überschichtet. Die zu trennende DNA wurde mit 0,2 Volumen Auftragspuffer

gemischt, bevor sie in eine Geltasche aufgetragen wurde. Das maximale Auftragsvolumen bei analytischen Gelen betrug 15 µl pro Tasche, bei präparativen Gelen 50 µl. Vom DNA-Marker wurden bei einem analytischen Gel 500 ng pro Spur eingesetzt, bei einem präparativen Gel 1 µg. Die Elektrophorese wurde bei analytischen Gelen mit einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt. Die Laufzeit wurde der Größe der erwarteten Fragmente angepasst. Bei präparativen Gelen wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 60 V durchgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese wurde so lang ausgedehnt, bis das zu isolierende Fragment deutlich sichtbar von anderen Fragmenten getrennt war.

2.4.21 Reinigung von DNA aus DNA-Agarose-Gelen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem DNA-Agarose-Gel (2.4.20) erfolgte unter Verwendung des Kits *Qiaquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach dem Protokoll *Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge* des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.4.22 Restriktion von DNA

Zur definierten Fragmentierung von DNA wurden Restriktionsenzyme des Typs II verwendet (Sambrook & Russel, 2001). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionen wurden meist 1-3 Einheiten (*units*) des Enzyms pro 1 µg zu spaltender DNA eingesetzt. Die Restriktionen wurden bezüglich der benötigten Zusätze wie z.B. BSA, Puffern und Reaktionstemperatur nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Dauer der Reaktionen betrug 30-120min.

2.4.23 Dephosphorylierung von Vektoren

Um die Zirkularisierung von linearisierten Vektoren bei der Ligation mit der T4 DNA-Ligase (siehe 2.4.24) zu verhindern, wurden die Vektoren einer Dephosphorylierung mit der Alkalischen Phosphatase unterzogen (Sambrook & Russel, 2001). Die Dephosphorylierung wurde direkt im Anschluss an die Restriktion im Restriktionsansatz durchgeführt, bevor der linearisierte Vektor mit einem präparativen DNA-Agarose-Gel (siehe 2.4.20) von den anderen Fragmenten getrennt wurde. Hatte der Vektor nach der Restriktion einen 5'-Überhang, wurden 1-2 µl Alkalischen Phosphatase in den abgeschlossenen Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert, bevor der Ansatz auf ein Gel aufgetragen wurde. Hatte der Vektor einen 3'-Überhang nach der

Restriktion, wurden zunächst 1-2 µl Alkalischen Phosphatase in den abgeschlossenen Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert, bevor nochmals 1-2 µl Alkalischen Phosphatase zugegeben und 30 min bei 55°C inkubiert wurde. Die zweite Inkubation diente dazu, die Doppelstränge des Vektors leicht aufzuspalten, damit die AP leichteren Zugang zur DNA bekommt, da die räumlichen Gegebenheiten bei 3'-Überhängen für die Alkalischen Phosphatase ungünstig sind. Anschließend wurde die DNA in einem präparativen DNA-Agarose-Gel (siehe 2.4.20) aufgetrennt.

2.4.24 Ligation von DNA

In einigen Fällen wurde vor dem Einsatz in die Ligation die benötigten Mengen von Vektor und Insert über ein analytisches DNA-Agarose-Gel abgeschätzt. Auf diesem wurden 2 verschiedene Mengen von Vektor und Insert neben dem λ-Marker (200 ng) aufgetragen. Für den λ-Marker sind in seiner Produktbeschreibung Angaben über die in den Banden enthaltene Menge an DNA aufgeführt. Die Ligationen wurden nach den Angaben des Herstellers der T4 DNA-Liagse mit den gewünschten DNA-Fragmenten angesetzt (Remaut *et al.*, 1983). Je nach Bedarf wurde den Angaben des Herstellers folgend inkubiert, z.B. 2 h bei ZT oder über Nacht bei 16°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze bei -20°C aufbewahrt.

Für einige Klonierungen musste ein Zwischenkonstrukt erstellt werden, in dem ein PCR-Produkt in den Vektor pCRII-TOPO ligiert wurde (pMaha-249, pMaha-343, pMaha-344). In Anlehnung an die Angaben des Herstellers wurden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung (mit dem Vektor mitgeliefert und 1:4 verdünnt mit MBW) und 1 µl Vektor pCRII-TOPO bei ZT für 30 – 40 min inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* TOP10 elektroporiert (siehe 2.3.5). Die Inkubation bei 37°C wurde für 45 min durchgeführt. Auf eine Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum wurden 40 µl X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml DMSO, Aufbewahrung bei 4°C) ausplattiert (Endkonzentration ca. 40 µg/ml) und nach dem Einziehen die Bakterien darauf ausplattiert. Bei 37°C wurde die Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten blaue und weiße Kolonien auf der Platte unterschieden werden. Bei den blauen Kolonien hatte eine Religation des Vektors pCRII-TOPO stattgefunden, bei den weißen eine Insertion des PCR-Produktes. Einzelne weiße Kolonien wurden zum Animpfen von Flüssig-Kulturen (siehe 2.3.2.2) verwendet.

2.4.25 Sequenzanalyse

Zur Überprüfung von Sequenzen bei verschiedenen Klonierungsschritten wurden Plasmide mit inserierter Sequenz zur Analyse an die Firma GATC versendet. Meistens wurden nur in den Vektor pCRII-TOPO inserierte Sequenzen zur Analyse versendet, wofür die Firma GATC die Primer vorliegen hat. Wurden zum Sequenzieren Primer benötigt, die nicht bei GATC vorlagen, wurden diese wie unter Abschnitt 2.1.4 beschrieben bei MWG bezogen und mit an GATC versendet. Die Sequenzen dieser Primer sind im Anhang in 0 aufgeführt. Die elektronisch übermittelten Sequenzen wurden mit dem Programm Vektor NTI überprüft.

2.4.26 Northern-Blot-Analyse

Für die Northern-Blot-Analyse wurde dieselbe RNA verwendet, die auch für die Mikroarray-Studie verwendet wurde (siehe Tabelle 31 im Anhang). Da die RNA für die Mikroarray-Studie bereits einige Monate zuvor hergestellt worden war, wurde sie zur Überprüfung von Reinheit und Integrität nochmals auf einem RNA-Gel kontrolliert (2.4.5) und die Absorption bei 260nm und 280nm gemessen (2.4.4; Daten nicht gezeigt).

Herstellung der nicht markierten Sonden

Mit geeigneten Primern (siehe Tabelle 17 im Anhang) und der genomischen DNA (siehe 2.4.15) wurde eine PCR in 4fachem Ansatz durchgeführt (siehe 2.4.19). Die PCR-Produkte entsprachen einem Sequenzabschnitt des zu untersuchenden Gens und hatten eine Größe zwischen 300 bp und 1150 bp. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (siehe 2.4.8) und auf einem analytischen DNA-Agarose-Gel (siehe 2.4.20) auf ihre Größe hin überprüft. Reinheit und Konzentration der PCR-Produkte wurden photometrisch bestimmt (siehe 2.4.4).

Elektrophorese von RNA

Für die Northern-Blot-Analyse wurden RNA-Gele (siehe 2.4.5) mit den Unterschieden gegossen, dass der Anteil an Agarose nur 0,7 % betrug und die Gele nur wenige mm hoch waren, was durch ein geringeres Gesamtvolumen der Matrix erreicht wurde. Es wurden 10-20 µg RNA pro Probe und Spur aufgetragen (auf jedem Gel von jeder Probe gleiche Mengen) und 2 µg RNA-Marker. Die Elektrophorese wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie unter 2.4.5 beschrieben. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele auf die benötigte Größe zugeschnitten (es musste ein Rand bleiben, um das Gel im Blotter fixieren zu können) und die Ecken markiert.

Anschließend wurde eine Aufnahme von den Gelen mit der Dokumentationsapparatur 1 oder 2 gemacht.

RNA-Transfer und Fixierung

Die Vorbereitung der Gele und Membranen für den RNA-Transfer wurde nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Für den RNA-Transfer wurde ein Whatman-Papier mit SSC (10x) getränkt und auf den Blotter gelegt. Anschließend wurde die vorbereitete Membran darauf gelegt und darüber die Maske. Dann wurde das Gel aufgelegt und mit etwa 1 l SSC (10x) überschichtet. Bei nicht ganz dichtem Aufbau der Apparatur wurde während des Transfers SSC (10x) nachgegossen, damit das Gel stets überschichtet blieb. Im ersten Schritt des Transfers wurde für 3 h mit 5 inches Hg transferiert und anschließend das SSC (10x) abgesaugt. Im zweiten Schritt wurde das Gel mit etwa 1 l Hydrolyse-Puffer überschichtet und für 0,5 h mit 5 inches Hg transferiert. Der zweite Schritt des Transfers mit dem basischen Hydrolyse-Puffer diente dazu die großen RNA-Moleküle leicht zu verkleinern, um sie effektiver transferieren zu können. Dieser Schritt wurde zeitlich streng begrenzt durchgeführt, damit nicht die gesamte RNA hydrolysiert wurde und in den Puffer diffundierte. Nach dem Transfer wurde die Membran 2x für 1 min vorsichtig in SSC (6x) geschwenkt, um die Agarose zu entfernen und den alkalischen pH-Wert auszugleichen. Nach dem Transfer wurde die Membran abgetupft und auf ein Tuch gelegt. Im Crosslinker wurde die RNA bei 125-150 mJ auf der Membran fixiert.

Sondenmarkierung, Hybridisierung und Detektion

Die folgenden Schritte wurden nach der Anleitung des Kits *ECL direct nucleic acid labelling and detection system* der Firma Amersham (siehe 2.1.7) durchgeführt. Das Markieren der Sonden erfolgte nach der Anleitung des Herstellers; vom RNA-Marker wurden 100 ng als Sonde markiert. Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde von der Membran mit der fixierten RNA die Spur des Marker abgeschnitten und mit markierter RNA-Marker-Sonde hybridisiert. Der große Abschnitt der Membran mit der zu untersuchenden RNA wurde mit der markierten Sonde für das entsprechende Gen hybridisiert. Die Reaktionen wurden in 50 ml-Gefäßen durchgeführt. Für die Membran mit den RNA-Proben wurden 7,5 ml Lösung verwendet, für die Membran mit dem Marker 5 ml. Das Waschen der Blots wurde nach der Anleitung des Kits durchgeführt. Die Detektion wurde mit der Gel-Dokumentationsapparatur 3 durchgeführt. Zur Abschätzung der

Detektionszeit wurde zunächst für nur 1 min detektiert. Anschließend wurde für 20 bis 60 min detektiert und eine Aufnahme von dem Blot gemacht.

2.4.27 RT-PCR

Die RT-PCR wurde in zwei getrennten Schritten (Rreverse Transkription und PCR) durchgeführt (*two step RT-PCR*). Die Reverse Transkription ist in Abschnitt 2.4.7 beschrieben. Für den Schritt der PCR wurde die synthetisierte cDNA mit entsprechenden Kontrollen in eine PCR (siehe 2.4.19) mit dem Enzym Platinum-Taq der Firma Invitrogen eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit einem Agarose-Gel (siehe 2.4.20) auf ihre Größe überprüft und die Gele mit der Gel-Dokumentationsapparatur 2 aufgenommen.

2.4.28 *real time* PCR

Die im Folgenden beschriebene *real time* PCR erfolgte in Anlehnung an die Angaben der Firma Applied Biosystems (http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/#rt_pcr). Bei der *real time* PCR mit absoluter Quantifizierung wurde für jedes Gen bei jeder Messung eine Standard-Kurve erstellt. Für die Standard-Kurve wurde ein Standard-*template* durch PCR (siehe 2.4.19) aus der genomischen DNA (siehe 2.4.15) von *M. haemolytica* amplifiziert, das in definierter Molekülzahl in sieben Verdünnungen logarithmischer Stufung als *template* in die Reaktion eingesetzt wurde. Anhand der Standard-Kurve wurde die Anzahl der *templates* in den zu untersuchenden Proben berechnet. Zur Prüfung der Qualität des PCR-Produkts wurde die Schmelzkurve in den zu untersuchenden Proben analysiert. Nur wenn ein einziges PCR-Produkt mit gleichem Schmelzpunkt wie bei den Standard-Proben entstanden war, wurden die Proben weiter ausgewertet. Es wurde eine Kontrolle ohne *template* gemacht (*non template control*, NTC) um zu prüfen, ob die Reaktionskomponenten rein waren. Eine Kontrolle, in der RNA als *template* eingesetzt wurde, diente zur Überprüfung auf die Abwesenheit von genomischer DNA.

Auswahl der Primer

Mit der Software *Primer Express* wurden unter Verwendung der Sequenz des zu untersuchenden Gens von *M. haemolytica* die Primer für die *real time* PCR ausgewählt, die zur Amplifikation einer Sequenz des Standard-*templates* bzw. der Probe eingesetzt werden sollten. Die beiden Primer für das Standard-*template* wurden anschließend mit der Software *Vector NTI* ausgewählt. Die PCR-Produkte, die als Standard-*templates* dienten, hatten eine Größe zwischen 700-1000 bp.

Erstellung von Standard-templates

Das mittels PCR (siehe 2.4.19) unter Verwendung der HiFi-Taq aus der genomischen DNA (siehe 2.4.15) von *M. haemolytica* amplifizierte Standard-*template* wurde aus einem präparativen DNA-Agarose-Gel (siehe 2.4.20) gereinigt (siehe 2.4.21). Konzentration und Reinheit wurden photometrisch bestimmt (siehe 2.4.4). Tabelle 19 im Anhang führt die Gene mit den zugehörigen Primern für die Standard-*templates* auf.

Bestimmung der optimalen Primer-Verhältnisse

Mit dem Standard-*template* und den Primern für die *real time* PCR wurde das optimale Verhältnis der beiden Primer bestimmt. Dies war notwendig, da die Hybridisierungstemperatur der Primer gleich war, es aber vorkommen konnte, dass nicht beide Primer gleichermaßen an das *template* hybridisieren. Die Primer wurden gegeneinander in den Konzentrationen 50 nM, 300 nM und 900 nM in eine *real time* PCR mit dem Standard-*template* des entsprechenden Gens eingesetzt. Das Primer-Verhältnis, bei dem der *cycle threshold* am kleinsten war, wurde später verwendet. Tabelle 20 im Anhang gibt die Primer mit ihren verwendeten Konzentrationen für die untersuchten Gene wieder.

Vorbereitungen für den *real time* PCR Lauf

Der *premix* für die *real time* PCR (Tabelle 7) wurde stets frisch angesetzt, wobei ein Überschussvolumen für Pipettierungenauigkeiten berücksichtigt wurde.

Tabelle 7 Beispielhafte Zusammenstellung für einen *premix* für die *real time* PCR*

Komponente	Volumen für 1 Reaktion [µl]	Volumen für 63 Reaktionen + 10% [µl]	Endkonzentration
2x Absolute SYBR Green ROX Mix	12,50	866,25	1 x
<i>forward primer</i> [10 µM]	2,25	155,93	900 nM
<i>reverse primer</i> [10 µM]	2,25	155,93	900 nM
MBW	3	207,90	-
Endvolumen	20	1386,01	-

*Als Beispiel wurden Primer gewählt, die beide in einer Konzentration von 900 nM verwendet werden und ein Experiment, bei dem für die Standard-*templates*, die NTC sowie 13 zu untersuchende Proben insgesamt 63 Vertiefungen belegt wurden.

Die *templates* wurden so verdünnt, dass jeweils 5 µl *template* zu 20 µl *premix* gegeben werden konnten. Die Konzentration des Standard-*templates* wurde an jedem Tag, an dem es bei der *real time* PCR eingesetzt wurde, neu bestimmt (2.4.4). Das Standard-*template*

Methoden

wurde so verdünnt, dass in 5 µl jeweils 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 bzw. 10^8 Moleküle enthalten waren. Die Ansätze mit den Standard-*templates* dienten auch als Positiv-Kontrollen. Die Proben von *in vitro* kultivierten Bakterien (Tabelle 31 im Anhang) wurden so verdünnt, dass in 5 µl 100 ng bzw. 10 ng cDNA enthalten waren; bei den Proben aus den infizierten Rindern waren in 5 µl 200 ng bzw. 50 ng Gesamt-cDNA (eukaryotische und prokaryotische) enthalten. Bei den Proben aus Rind wurde mit 50 ng mehr cDNA in der niedrigeren Konzentration eingesetzt, da der Anteil an bakterieller cDNA geringer war als der Anteil an cDNA vom Rind.

Folgende Negativ-Kontrollen wurden bearbeitet: Bei der Kontrolle NTC (*non template control*) wurde das *template* durch 5 µl MBW ersetzt. Eine weitere Kontrolle enthielt als *template* die gereinigte RNA, aus der die cDNA gewonnen wurde, um zu zeigen, dass keine genomische DNA mehr in der RNA vorhanden war, die als *template* für die *real time* PCR fungieren könnte. So ließ sich zeigen, dass die PCR-Produkte bei den untersuchten Proben letztlich auf der RNA beruhten und nicht auf Kontaminationen mit genomischer DNA. Die Negativ-Kontrolle der cDNA-Synthese wurde aus Mengengründen nur für ein Gen auf einer Platte in Dreifach-Messung als *template* eingesetzt. Sie zeigte, dass die Komponenten der cDNA-Synthese nicht mit DNA verunreinigt worden waren. Bei der Untersuchung der *in vivo*-Proben wurden als Negativ-Kontrollen 200 ng von der RNA aus nicht infiziertem Rind und 200 ng der daraus hergestellten cDNA als *template* eingesetzt.

Durch Kontaminationen oder Fehlbindungen der Primer wurde häufig ein PCR-Produkt in den Kontrollen amplifiziert. War der *cycle threshold* für die Kontrollen jedoch deutlich höher als der bei den untersuchten Proben, dann war dies ausreichend, um die *real time* PCR quantitativ auswerten zu können.

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 20 µl *premix* vorgelegt und anschließend 5 µl zu untersuchende Probe bzw. Standard-*template* zugegeben. Für jede Probe bzw. jedes Standard-*template* wurden drei Vertiefungen belegt.

Mit jeder cDNA wurden drei voneinander unabhängige *real time* PCR-Läufe durchgeführt, so dass für jedes untersuchte Gen die berechnete Molekülanzahl aus 9 Messungen vorlag. Die Reaktionen für die Standard-Kurve wurden stets auf jeder Platte mitgeführt.

Der *real time* PCR Lauf

Die Platte mit den Proben wurde mit einer Folie verschlossen und durch Steuerung mit der Software *Abi Prism* im *Real Time Cycler* wie folgt temperiert und gemessen: Zu Beginn wurde eine lange Denaturierung der cDNA für 15 min bei 94°C durchgeführt, bei der

auch das Enzym Thermo-Start DNA Polymerase aktiviert wurde. 40mal hintereinander wurde für 15 sec bei 94°C denaturiert und für 1 min bei 60°C die Primer angelagert und die Elongation durchgeführt.

Die Software *Abi Prism* erstellte neben den Kurven der Amplifikationen auch die Schmelzkurven für die amplifizierten PCR-Produkte zu Verfügung. Ebenso erstellte es die Standard-Kurve und eine Tabelle mit den *cycle thresholds* und den berechneten Molekülzahlen.

Qualitätskontrolle

Durch den Fluoreszenz-Farbstoff ROX im *premix*, der als passive Referenz nicht an der Amplifikation beteiligt ist, wurden Pipettier-Fehler bei der Zugabe des *premixes* sowie Messunterschiede zwischen den Vertiefungen der Platte ausgeglichen. Pipettier-Fehler bei der Zugabe des *templates* konnten durch die Dreifachmessung erkannt werden. Die Standard- *templates* wurden in 7 verschiedenen Konzentrationen gemessen, die zu untersuchenden Proben in 2 verschiedenen Konzentrationen. Bei den Standard- *templates* und den Proben aus *in vitro* kultivierten Bakterien, war der Unterschied in den Konzentrationen 10-fach, so dass optimaler Weise der Unterschied im *cycle threshold* von Konzentration zu Konzentration bei 3,3 und der in der berechneten Anzahl an Molekülen bei 10 lag. Bei den Proben aus den infizierten Rindern lag der Unterschied in der Konzentration bei 4, was optimaler Weise zu einem Unterschied im *cycle threshold* von 2 und bei der berechneten Anzahl an Molekülen von 4 führte.

Auswertung

Von jedem der drei unabhängigen *real time* PCR-Läufe für jedes Gen berechnete die Software *Abi Prism* anhand der Standard-Kurve für jede untersuchte Probe die Anzahl an Molekülen, die in der Probe als *template* zur Verfügung gestanden hatten. Aus den 9 berechneten Molekül-Anzahlen für jedes Gen-Transkript wurden maximal 3 Werte mit der stärksten Abweichung eliminiert. Für die in die Auswertung eingehenden Werte wurden der Mittelwert und die Standard-Abweichung berechnet.

Die bei der *real time* PCR ermittelten Daten wurden für zwei verschiedene Vergleiche eingesetzt. Bei einem Vergleich wurden die bei der *real time* PCR ermittelten Daten mit den bei der Mikroarray-Analyse ermittelten Daten für diese Gene verglichen. Dabei wurde bei beiden Methoden die RNA verwendet, die für die Mikroarray-Studie aus den *in vitro* kultivierten Bakterien isoliert wurde (Tabelle 31 im Anhang).

Methoden

Beim zweiten Vergleich wurden die zu vergleichenden Daten alle mit der *real time* PCR generiert, aber die zu Grunde liegende RNA stammte einmal aus *in vitro* herangezogenen *M. haemolytica*-Kulturen ((Tabelle 31 im Anhang) und einmal aus mit *M. haemolytica* infiziertem Lungengewebe. Um ein Maß für die Stärke der Transkription *in vivo* zu haben wurde die Transkription der gleichen Gene *in vitro* nach 60 min Wachstum unter Eisenmangel aus der Mikroarray-Studie herangezogen. Dies war der längste untersuchte Zeitraum in der Mikroarray-Studie und bildete die Infektion am ehesten ab. Als basale Transkription der beiden untersuchten Gene (*hmbR1* und *hmbR2*) wurde in diesem Vergleich für beide Nachweise (*in vitro* und *in vivo*) die Kontrollkultur verwendet, bei der in der Mikroarray-Studie die Bakterien ohne Eisenmangel kultiviert wurden. Die Bakterien, mit denen die Rinder infiziert worden waren, waren auf die gleiche Weise kultiviert und bei gleicher optischer Dichte geerntet worden wie die Bakterien, die für die Mikroarray-Studie verwendet worden waren.

Für beide Vergleiche wurden die Daten aus der *real time* PCR (und auch die aus der Mikroarray-Analyse) auf das Kontrollgen *recA* normalisiert. Die Veränderung der Transkription einzelner Gene wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Veränderungsfaktor} \\ = (\text{Zielgen (Zeitpunkt / Kontrolle)} / \text{Kontrollgen } recA \text{ (Zeitpunkt / Kontrolle)})$$

wobei: Zeitpunkt = Wachstum unter Eisenmangel für 15, 30 bzw. 60 min
 Kontrolle = Wachstum im Vollmedium BHI

Wurden die Daten der *real time* PCR verwendet, wurde mit dem Mittelwert der Molekülzahlen (s. o.) gerechnet, wurden die Daten der Mikroarray-Analyse verwendet, wurde mit RFU gerechnet.

Die Berechnung für die Transkriptionsänderung bei der *real time* PCR wurde damit anders durchgeführt als bei der Mikroarray-Studie. Z. B. entfällt bei der Mikroarray-Studie eine Normalisierung auf ein bestimmtes Kontrollgen, da die Normalisierung durch den *Background Average* und den *Scaling factor* durchgeführt wurde. Ein technischer Unterschied zwischen den Methoden liegt darin, dass bei der Mikroarray-Studie die RNA von drei unabhängigen Experimenten miteinander verglichen wurde. Bei der *real time* PCR dagegen wurden von derselben RNA ausgehend drei unabhängige Messungen mit Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus der Mikroarray-Studie vorliegenden Faktoren der Transkriptionsänderung können deshalb nicht direkt zum Vergleich mit den Daten

der *real time* PCR herangezogen werden. Aus diesem Grund wurde die Transkriptionsänderung bei der Mikroarray-Studie für den Vergleich mit der *real time* PCR nach der gleichen Methode berechnet wie mit den Daten der *real time* PCR. Bei den Mikroarray-Daten gibt es dementsprechend keine Mittelwerte und Standardabweichungen, denn für die Mikroarray-Werte wurde nur mit dem einen Signalwert des entsprechenden Mikroarrays gerechnet, dessen RNA auch für die *real time* PCR verwendet wurde. Bei der *real time* PCR wurde der Mittelwert aus den verwertbaren Messungen mit 10 ng cDNA als Template zur Berechnung verwendet. Die Faktoren der Transkriptionsänderung bei der Mikroarray-Analyse ändern sich bei Berechnung mit Normalisierung auf *recA* nur unwesentlich (Daten nicht gezeigt).

3 Ergebnisse

3.1 Transkriptionsprofil von *M. haemolytica* bei Eisenmangel *in vitro*

Mittels Mikroarray-Analyse wurde gezeigt, dass 129 Gene von *M. haemolytica* bei Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* ihre Transkription veränderten. Die Venn-Diagramme der Abb. 11 zeigen, wie viele Gene bei mindestens einem Zeitpunkt (15, 30 oder 60 min) eine mindestens 2fache oder höhere Abweichung von der Kontrolle (Wachstum in Vollmedium) aufwiesen. Es wurden etwa gleich viele Gene verstärkt (63 Gene) bzw. vermindert (66 Gene) transkribiert. Die Regulation von jeweils zwei Dritteln der Gene war über 60 min konstant, entweder verstärkt (37 Gene) oder vermindert (44 Gene). Von den Genen mit konstant verstärkter Transkription kodieren 29 für Proteine, die an den Prozessen der Eisenaufnahme des Bakteriums beteiligt sind (Tabelle 8). Bei den Genen mit konstant verminderter Transkription kodieren 22 für Proteine, die Eisen enthalten (Tabelle 9). Ein Drittel der Gene zeigte bei nur einem Zeitpunkt eine veränderte Transkription im Vergleich zur Kontrolle. Bei ihnen zeichnete sich eine größere Gruppe bei 60 min ab (19 Gene mit verstärkter Transkription und 14 Gene mit verminderter Transkription).

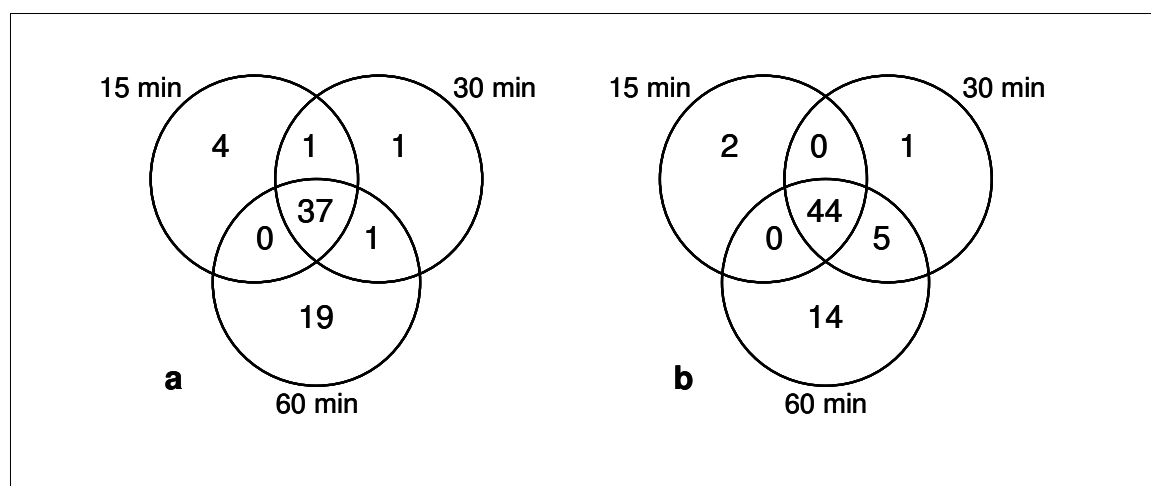


Abb. 11 Venn-Diagramme der unter Eisenmangel regulierten Gene von *M. haemolytica*. Insgesamt 129 Gene zeigten eine veränderte Transkription als Reaktion auf Eisenmangel. **a:** 63 Gene mit verstärkter Transkription, **b:** 66 Gene mit verminderter Transkription

Das Balkendiagramm in der folgenden Abbildung (Abb. 12) zeigt, auf welche funktionellen Gruppen sich die kodierten Proteine der Gene mit verstärkter bzw. verminderter Transkription verteilen.

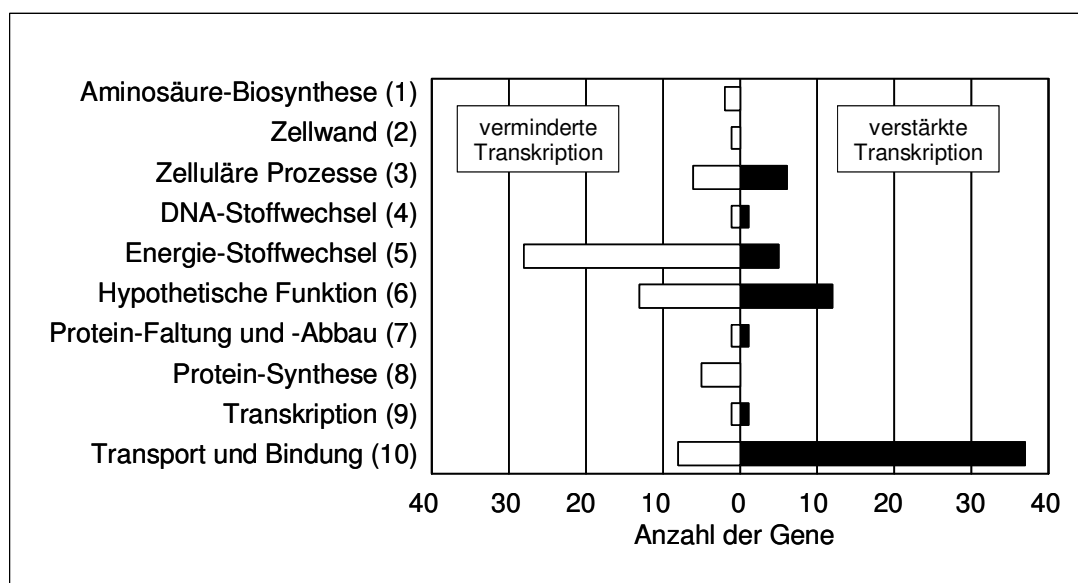


Abb. 12 Funktionelle Klassifizierung der eisenregulierten Gene von *M. haemolytica*
Offene und geschlossene Balken zeigen die Anzahl der Gene mit verminderter bzw. verstärkter Transkription. Den funktionellen Gruppen wurde (in Klammern) eine Nummer zugeordnet, die in Tabelle 8 und Tabelle 9 die Gruppenzugehörigkeit angibt.

Die Gene, die für Transport- und Bindungsproteine kodieren, bildeten die Gruppe mit der meisten Anzahl an verstärkt transkribierten Genen (37 Gene). Von diesen Genen kodieren 28 für Proteine mit bekannter oder postulierter Funktion beim Eisentransport, wie Rezeptoren der äußeren Membran, Transportproteine durch das Periplasma oder Permeasen und assoziierte ATPasen an der inneren Membran. In dieser Gruppe sind auch 10 der 11 am stärksten induzierten Gene enthalten (mehr als 16fach über alle Zeiten bei Eisenmangel; Tabelle 8).

Die Gene, deren kodierte Proteine eine Funktion im Energie-Stoffwechsel haben, bildeten die größte Gruppen an Genen mit verminderter Transkription (28 Gene). Diese Gene kodieren für Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern oder Enzyme mit Häm bzw. Hämin als prosthetischer Gruppe (Tabelle 9). Die Gene der jeweils zweitgrößten Gruppe der Gene mit verstärkter bzw. verminderter Transkription kodieren für Proteine mit hypothetischen Funktionen (12 bzw. 13 Gene).

Tabelle 8 Gene von *M. haemolytica* mit verstärkter Transkription bei Eisenmangel

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins	Signalwert ²			FG ³	AN ⁴
		15 min	30 min	60 min		
<i>fhuB</i>	<i>Ferrichrome transport, permease protein</i>	8,6	8,0	7,6	10	EF027356
<i>fhuC</i>	<i>Ferrichrome transport, ATP-binding protein</i>	7,9	7,6	7,1	10	DQ680182
<i>mh0656</i>	<i>Possible lipoprotein involved in haemin uptake (Cj0177)</i>	7,5	7,5	7,3	10	DQ680183
<i>hmbR1</i>	<i>Haemoglobin receptor HmbR1</i>	6,9	7,0	7,2	10	DQ680184
<i>fhuD</i>	<i>Ferrichrome transport, periplasmic protein precursor</i>	5,3	4,7	4,7	10	DQ680185
lldD	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	5,3	5,3	4,9	5	EF027357
<i>mh0652</i>	<i>Haemin ABC transport system, permease protein</i>	4,9	4,7	4,8	10	DQ680186
<i>mh0655</i>	<i>Possible haemin receptor (Cj0178)</i>	4,6	4,3	4,2	10	EF027358
<i>mh0651</i>	<i>Haemin ABC transporter, periplasmic protein PhuT</i>	4,6	4,7	4,8	10	DQ680187
<i>frpB</i>	<i>Ferric enterobactin receptor</i>	4,6	4,5	4,4	10	DQ680188
hmbR2	<i>Haemoglobin receptor HmbR2</i>	4,4	4,4	4,5	10	EF027359
<i>mh0653</i>	<i>Haemin ABC transport system, ATP-binding protein</i>	3,7	3,5	3,6	10	DQ680189
<i>mh1771</i>	<i>Possible ABC transporter, ferric ion-binding protein</i>	3,3	3,3	3,0	10	DQ680190
<i>mh1506</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	3,2	3,1	3,2	6	DQ680191
hugZ	<i>Possible protein involved in haem detoxification</i>	2,8	2,6	2,5	3	DQ680192
<i>tbpA</i>	<i>Transferrin binding protein A</i>	2,8	2,8	2,8	10	DQ680193
<i>mh0584</i>	<i>Possible periplasmic protein involved in iron transport</i>	2,7	2,7	2,8	10	DQ680194
mh1440	<i>Possible cation transport ATPase</i>	2,6	2,4	2,9	10	DQ680195
mh1766	<i>Possible H⁺/Na⁺ dependent permease</i>	2,6	2,7	2,5	10	DQ680196
pacs	<i>Cation transport ATPase</i>	2,4	2,4	2,9	10	DQ680197
fbpA	<i>Periplasmic iron binding protein A precursor</i>	2,3	2,5	2,4	10	DQ680198
<i>tbpB</i>	<i>Transferrin binding protein B</i>	2,2	2,2	2,1	10	DQ680199
<i>mh0587</i>	<i>Possible Fe²⁺/Pb²⁺ permease</i>	2,2	2,4	2,5	10	DQ680200
<i>mh0585</i>	<i>Possible iron dependent peroxidase</i>	2,0	2,2	2,5	3	DQ680201
mh1083	<i>Conserved protein of unknown function</i>	1,8	2,0	2,4	6	DQ680202
yfeB	<i>ABC transport system, ATP-binding protein</i>	1,7	1,7	1,9	10	DQ680203
yfeC	<i>ABC transport system, permease protein</i>	1,7	1,3	1,4	10	DQ680204
yfeA	<i>ABC transport system, periplasmic protein</i>	1,6	1,9	1,6	10	DQ680205
<i>mh1547</i>	<i>Possible NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2</i>	1,6	1,3	1,2	5	EF027360
mh0368	<i>Conserved protein of unknown function</i>	1,6	1,5	1,4	6	DQ680206
yfeD	<i>ABC transport system, permease protein</i>	1,5	1,3	1,4	10	DQ680207
<i>mh1130</i>	<i>ABC transport system, periplasmic protein</i>	1,5	1,7	1,6	10	DQ680208
fbpC	<i>Ferric cations import, ATP-binding protein</i>	1,3	0,9	0,9	10	DQ680209
exbD	<i>Biopolymer transport protein</i>	1,3	1,3	1,3	10	DQ680210
<i>mh0586</i>	<i>Possible Fe²⁺/Pb²⁺ permease</i>	1,2	1,2	1,4	10	DQ680211
exbB	<i>Biopolymer transport protein</i>	1,2	1,1	1,2	10	DQ680212
fbpB	<i>Putative transmembrane iron III permease</i>	1,1	0,9	0,7	10	DQ680213
tonB	<i>TonB protein</i>	1,1	0,9	0,9	10	DQ680214
<i>pks</i>	<i>Possible polyketide synthase</i>	1,1	0,9	0,7	3	DQ680215
mh0741	<i>Conserved protein of unknown function</i>	1,1	1,3	1,8	6	DQ680216
mh0467	<i>Sodium/dicarboxylate symporter</i>	1,1	1,1	1,0	10	DQ680217
<i>mh1129</i>	<i>ABC transport system, permease protein</i>	1,1	1,1	0,7	10	DQ680218
<i>mh1084</i>	<i>Transcriptional regulator, AraC/XylS family</i>	0,9	1,0	1,4	9	DQ680219
<i>mh1179</i>	<i>Phosphotransferase enzyme II, ABC component</i>	0,6	0,8	1,2	10	DQ680220
htrA	<i>Possible periplasmic serine protease precursor</i>	0,5	0,8	1,0	7	DQ680221
<i>mh0603</i>	<i>Hypothetical protein</i>	0,5	0,9	1,5	6	DQ680222
tpx	<i>Thiol peroxidase</i>	0,5	0,7	1,1	3	DQ680223
<i>mh2311</i>	<i>Hypothetical protein</i>	0,5	0,7	1,0	6	EF027361
<i>mh1195</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	0,5	0,7	1,2	6	DQ680224
<i>mh2057</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	0,4	0,6	1,1	6	DQ680225
<i>mh2205</i>	<i>Hypothetical protein</i>	0,3	0,7	1,0	6	DQ680226

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins	Signalwert ²			FG ³	AN ⁴
		15 min	30 min	60 min		
mh0167	<i>Possible amino sugar epimerase</i>	0,3	1,0	0,6	5	DQ680227
<i>xyIB</i>	<i>D-xylulokinase</i>	0,3	0,5	1,1	5	EF027362
<i>mh2179</i>	<i>Possible DNA-binding protein</i>	0,3	0,8	1,1	4	DQ680228
<i>mh1315</i>	<i>Hypothetical protein</i>	0,3	0,8	1,9	6	DQ680229
mh0388	<i>Cell division inhibitor</i>	0,3	0,9	1,3	3	DQ680230
glgA	<i>Glycogen synthase</i>	0,3	0,6	1,1	5	DQ680231
<i>mh0506</i>	<i>Sugar ABC transporter, periplasmic protein</i>	0,3	0,4	1,2	10	DQ680232
mh0733	<i>Conserved protein of unknown function</i>	0,2	0,5	1,7	6	DQ680233
mh1158	<i>Phosphonate monoester hydrolase</i>	0,2	0,4	1,0	3	DQ680234
corA	<i>Magnesium and cobalt transport protein</i>	0,2	0,6	1,2	10	DQ680235
mh1282	<i>Possible protein involved in Mg(2+) transport</i>	0,2	0,4	1,2	10	DQ680236
mh2546	<i>Conserved protein of unknown function</i>	0,1	0,4	1,0	6	DQ680237

¹Insgesamt wurden 63 Gene identifiziert. Fett gedruckte Namen der Gene weisen darauf hin, dass ein homologes Gen in *P. multocida* existiert.

²Der Signalwert ist angegeben als der \log_2 des Verhältnisses (Signalwert des Medians des Zeitpunkts/Signalwert des Medians der Kontrolle). Die Signalwerte der Mediane stammen aus 3 unabhängigen Messungen der Mikroarray-Studie. In dieser Tabelle entspricht ein Signalwert von 1 einer 2fachen Veränderung in der Transkription im Vergleich zur Kontrolle.

³Funktionelle Gruppe; 1: Aminosäure-Biosynthese, 2: Zellwand, 3: Zelluläre Prozesse, 4: DNA-Stoffwechsel, 5: Energie-Stoffwechsel, 6: Hypothetische Funktion, 7: Protein-Faltung und -Abbau, 8: Protein-Synthese, 9: Transkription, 10: Transport und Bindung (siehe auch Abb. 12).

⁴Accession Number des National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Tabelle 9 Gene von *M. haemolytica* mit verminderter Transkription bei Eisenmangel

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins	Signalwert ²			FG ³	AN ⁴
		15 min	30 min	60 min		
napB	<i>Cytochrome C-type protein precursor</i>	-3,9	-3,9	-4,1	5	DQ680238
napC	<i>Cytochrome C-type protein</i>	-3,6	-3,8	-4,4	5	DQ680239
<i>mh0510</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-3,6	-4,1	-3,8	6	DQ680240
napA	<i>Periplasmic nitrate reductase precursor</i>	-3,5	-3,0	-2,8	5	DQ680241
napF	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-3,5	-3,2	-3,4	5	DQ680242
napD	<i>NapD protein</i>	-3,4	-3,2	-3,3	5	DQ680243
nrfA	<i>Cytochrome D552 precursor</i>	-3,3	-3,6	-3,7	5	DQ680244
mh0989	<i>Possible conserved iron-sulfur protein</i>	-3,3	-3,4	-4,0	6	DQ680245
mh0987	<i>Glycolate oxidase</i>	-3,3	-3,8	-4,0	3	DQ680246
nrfC	<i>Nitrite reductase, Fe-S protein</i>	-2,9	-2,6	-2,2	5	DQ680247
mh0988	<i>Possible iron-sulfur binding reductase</i>	-2,8	-2,8	-3,1	5	DQ680248
napG	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-2,7	-2,5	-2,5	5	DQ680249
<i>merP</i>	<i>Possible mercuric ion scavenger protein</i>	-2,7	-3,6	-3,3	6	DQ680250
napH	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-2,7	-2,6	-3,3	5	DQ680251
merT	<i>Mercuric ion transport protein</i>	-2,5	-2,9	-2,7	10	DQ680252
fdxI	<i>Formate dehydrogenase, gamma subunit</i>	-2,5	-2,8	-2,8	5	DQ680253
fdxH	<i>Formate dehydrogenase, beta subunit</i>	-2,4	-2,4	-2,7	5	DQ680254
<i>mh0511</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-2,4	-3	-2,9	6	DQ680255
<i>adh2</i>	<i>Aldehyde-alcohol dehydrogenase II</i>	-2,4	-2,6	-2,5	5	DQ680256
fdhE	<i>FdhE protein</i>	-2,3	-2,4	-2,4	5	DQ680257
mh0969	<i>Possible secreted cysteine protease</i>	-2,3	-2,7	-2,2	7	DQ680258
nrfB	<i>Cytochrome c-type protein precursor</i>	-2,2	-2,5	-2,6	5	DQ680259
nrfD	<i>Nitrite reductase, transmembrane protein</i>	-2,0	-1,9	-2,0	5	DQ680260
<i>nikC</i>	<i>Nickel transport system, permease protein</i>	-1,9	-2,3	-2,8	10	DQ680261
rpL31	<i>50S ribosomal protein L31</i>	-1,8	-2,1	-2,2	8	DQ680262

Ergebnisse

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins	Signalwert ²			FG ³	AN ⁴
		15 min	30 min	60 min		
<i>mh1749</i>	<i>Identity to chloroplast 50 S ribosomal protein L36</i>	-1,6	-2,0	-2,3	8	DQ680263
frdB	<i>Fumarate reductase, iron-sulfur protein</i>	-1,5	-1,3	-1,3	5	DQ680264
fdxG	<i>Formate dehydrogenase, alpha major subunit</i>	-1,5	-1,9	-1,8	5	DQ680265
frdA	<i>Fumarate reductase, flavoprotein subunit</i>	-1,4	-1,4	-1,0	5	DQ680266
ccmF	<i>Cytochrome C-type biogenesis protein</i>	-1,4	-1,5	-1,5	5	DQ680267
fis	<i>Transcriptional regulator, Fis family</i>	-1,3	-1,3	-2,0	9	DQ680268
<i>mh0845</i>	<i>ABC transporter, ATP-binding protein</i>	-1,3	-1,8	-1,9	10	DQ680269
<i>mh0849</i>	<i>ABC transporter, periplasmic protein</i>	-1,3	-1,6	-2,1	10	DQ680270
frdC	<i>Fumarate reductase</i>	-1,3	-1,4	-1,0	5	DQ680271
torC	<i>Cytochrome c-type protein</i>	-1,3	-1,1	-1,3	5	DQ680272
nifR3	<i>Possible nitrogen fixation protein</i>	-1,3	-1,6	-1,9	3	DQ680273
gltX	<i>Glutamyl-tRNA reductase</i>	-1,3	-1,4	-1,2	8	DQ680274
mh1433	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-1,2	-1,2	-1,1	6	DQ680275
mh2573	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-1,1	-1,5	-1,6	6	DQ680276
frdD	<i>Fumarate reductase</i>	-1,1	-0,9	-0,5	5	DQ680277
<i>mh0847</i>	<i>ABC transporter, permease protein</i>	-1,1	-1,6	-2,0	10	DQ680278
mh1465	<i>Possible soluble cytochrome B562 precursor</i>	-1,0	-0,7	-0,8	5	DQ680279
fdxG	<i>Formate dehydrogenase, alpha major subunit</i>	-1,0	-1,0	-1,0	5	DQ680280
mh2555	<i>Periplasmic protein precursor</i>	-1,0	-1,4	-1,8	6	DQ680281
cydA	<i>Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit</i>	-1,0	-1,1	-1,2	5	EF027363
mh1646	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-1,0	-1,1	-1,4	6	DQ680282
fimA	<i>High affinity zinc uptake system protein precursor</i>	-0,9	-1,0	-1,6	2	DQ680283
nrdA	<i>Ribonucleotide reductase alpha chain</i>	-0,9	-1,2	-1,0	4	DQ680284
ompH	<i>Outer membrane protein P2 precursor</i>	-0,9	-1,1	-1,7	10	DQ680285
ilvM	<i>Possible acetolactate synthase, small subunit</i>	-0,7	-0,5	-1,2	1	DQ680286
dppD	<i>Dipeptide transport ATP-binding protein</i>	-0,7	-1,0	-1,2	10	DQ680287
nrfE	<i>Cytochrome C-type biogenesis protein</i>	-0,7	-0,9	-1,1	5	DQ680288
nqrE	<i>Na-NQR complex subunit 5</i>	-0,6	-1,0	-0,9	5	DQ680289
tolQ	<i>TolQ protein</i>	-0,5	-0,9	-1,5	3	DQ680290
<i>mh2024</i>	<i>Hypothetical protein</i>	-0,5	-0,7	-1,2	6	DQ680291
tolA	<i>TolA protein</i>	-0,5	-0,6	-1,5	3	DQ680292
tolR	<i>TolR protein</i>	-0,5	-0,5	-1,0	3	DQ680293
mh0073	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-0,4	-0,7	-1,1	6	DQ680294
mh1494	<i>Possible GTP-binding factor</i>	-0,4	-0,7	-1,6	6	DQ680295
deaD	<i>ATP-dependent RNA helicase</i>	-0,4	-0,9	-1,2	8	DQ680296
<i>mh0708</i>	<i>Hypothetical protein</i>	-0,4	-0,7	-1,7	6	DQ680297
tyrP	<i>Tyrosine permease 2</i>	-0,4	-0,9	-1,5	10	DQ680298
mh1031	<i>Ketol-acid reductoisomerase</i>	-0,3	-0,9	-1,3	1	DQ680300
rpS8	<i>30S ribosomal protein S8</i>	-0,3	-0,6	-1,1	8	DQ680301
mh1349	<i>Glycerate kinase</i>	-0,2	-0,2	-1,2	3	DQ680302
mh0070	<i>Conserved protein of unknown function</i>	-0,2	-1,3	-1,7	6	DQ680303

¹Insgesamt wurden 66 Gene identifiziert.
Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 8.

3.2 Transkriptionsprofil von *P. multocida* bei Eisenmangel *in vitro*

P. multocida wurde wie *M. haemolytica* unter Eisenmangel und in Vollmedium kultiviert. Mittels Mikroarray-Analyse wurde gezeigt, dass dabei 173 Gene eine veränderte Transkription aufwiesen. Die Transkription dieser 173 Gene zeigte bei mindestens einem Zeitpunkt eine 2fache oder höhere Abweichung zur Kontrolle.

Die erstellten Venn-Diagramme (Abb. 13) verdeutlichen, dass mehr Gene verstärkt (93 Gene) als vermindert (80 Gene) transkribiert wurden. Jeweils 42 der induzierten bzw. der reprimierten Gene waren über alle 3 Zeitpunkte konstant verändert transkribiert. Von den konstant induzierten Genen kodieren 16 für Transport- und Bindungsproteine, die an den Eisenaufnahme-Prozessen von *P. multocida* beteiligt sind, und 11 für Proteine mit hypothetischen Funktionen (Tabelle 10). Von den 42 Genen mit konstant verminderter Transkription kodieren 20 für Proteine des Energie-Stoffwechsels (Tabelle 11). Die Gene, die in den Venn-Diagrammen nur bei 15 und bei 60 min aber nicht bei 30 min verändert transkribiert dargestellt sind, lagen bei 30 min nur knapp unterhalb des 2fachen Unterschieds zur Kontrolle. Dies trifft auch auf das nur bei 15 min induzierte Gen zu (Abb. 13a). Nach den Genen mit konstanter Transkriptionsänderung fällt eine zweite große Gruppe von Genen auf. Sie wird von den Genen gebildet, die ab 30 min bis zum Zeitpunkt von 60 min verändert transkribiert wurden (45 der induzierten Gene und 28 der reprimierten Gene).

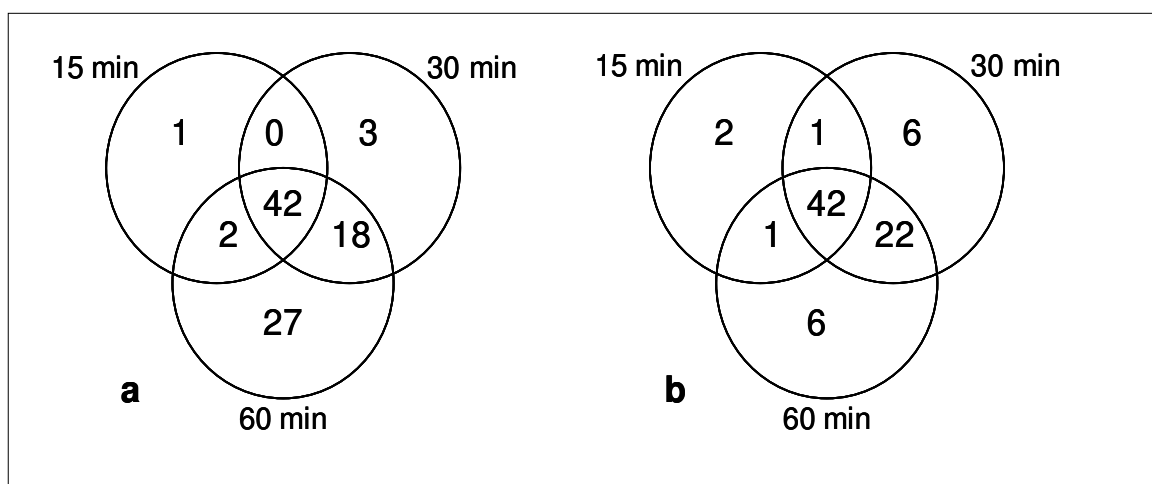


Abb. 13 Venn-Diagramme der unter Eisenmangel regulierten Gene von *P. multocida*. Insgesamt 173 Gene zeigten eine veränderte Transkription als Reaktion auf Eisenmangel. a: 93 Gene mit verstärkter Transkription b: 80 Gene mit verminderter Transkription

Das Balkendiagramm in Abb. 14 zeigt, auf welche funktionellen Gruppen sich die kodierten Proteine der 173 Gene von *P. multocida* mit veränderter Transkription aufteilen.

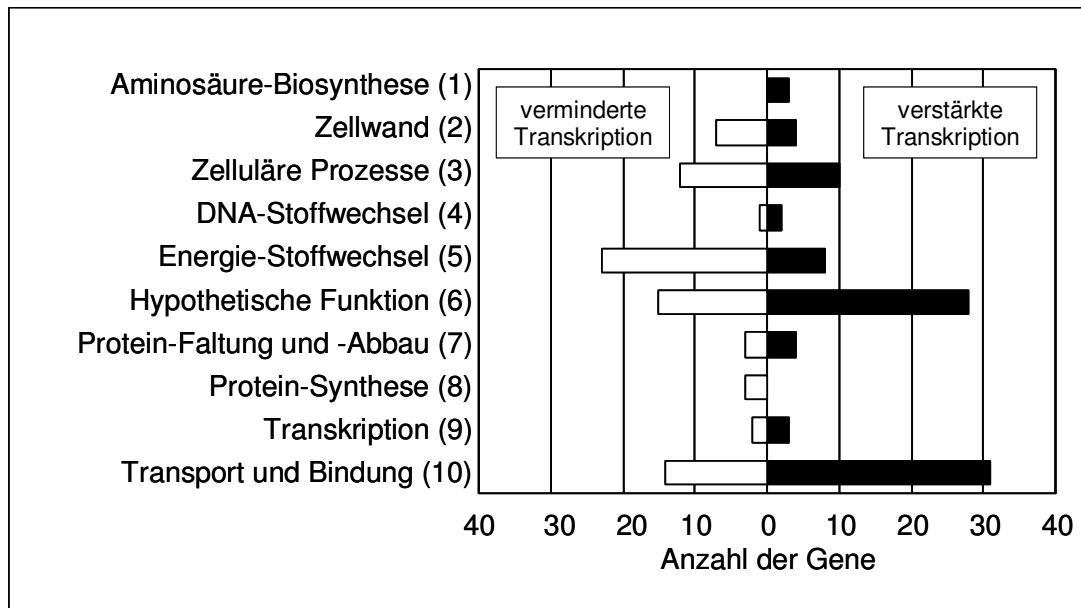


Abb. 14 Funktionelle Klassifizierung der eisenregulierten Gene von *P. multocida*
 Offene und geschlossene Balken zeigen die Anzahl der Gene mit verminderter bzw. verstärkter Transkription. Den funktionellen Gruppen wurde (in Klammern) eine Nummer zugeordnet, die in Tabelle 10 und Tabelle 11 die Gruppenzugehörigkeit angibt.

Die Gene, deren Proteine eine Funktion bei Transport und Bindung besitzen, stellten die größte Gruppe bei den Genen mit verstärkter Transkription (31 Gene). Davon kodieren 20 für Proteine, die an der Eisenaufnahme von *P. multocida* beteiligt sind (Tabelle 10). Die Anzahl der Gene, die für Transport- und Bindungsproteine kodieren, war mit 13 Genen auch bei den Genen mit verminderter Transkription in Relation zu den anderen funktionellen Gruppen hoch. Hier waren 4 Gene enthalten (*ccmABCD*), die für verschiedene ATP-Bindungsproteine von Haem-Exportern kodieren (Tabelle 11 und May *et al.*, 2001). Mit 23 Genen war bei den reprimierten Genen jedoch die Gruppe der Gene am größten, die für Proteine des Energie-Stoffwechsels kodieren (Tabelle 11). Die Gene der jeweils zweitgrößten Gruppe an Genen mit verstärkter bzw. verminderter Transkription kodieren für Proteine mit hypothetischen Funktionen (28 bzw. 15 Gene).

Tabelle 10 Gene von *P. multocida* mit verstärkter Transkription bei Eisenmangel

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	Signalwert ³			FG ⁴
		15 min	30 min	60 min	
<i>pm0042</i>	<i>Hypothetical</i>	6,4	6,7	6,8	6
<i>pfhR</i>	<i>Haemin receptor</i>	6,0	6,2	6,1	10
<i>pm0041</i>	<i>Hypothetical ABC transporter, ATP binding protein I</i>	5,8	5,8	5,9	10
<i>ars</i>	<i>Arylsulfatase precursor</i>	5,2	4,7	4,5	3
<i>pqqL</i>	<i>Zinc-dependent protease</i>	4,7	4,6	5,1	7
<i>pm0803</i>	<i>putative outer membrane iron transporter</i>	4,4	4,3	4,6	10
<i>speF</i>	<i>Ornithine decarboxylase</i>	3,0	2,9	2,2	3
<i>potE</i>	<i>Putrescine-ornithine antiporter</i>	3,0	2,9	1,9	10
<i>pm0337</i>	<i>Haemoglobin/haptoglobin binding protein</i>	2,9	2,7	2,9	10
<i>pm0805</i>	<i>Hypothetical</i>	2,6	2,4	2,0	6
<i>pm0452</i>	<i>Hypothetical</i>	2,5	2,9	3,4	6
<i>pm0453</i>	<i>Hypothetical</i>	2,5	2,5	3,0	6
<i>hmbR</i>	<i>Haemoglobin receptor precursor</i>	2,5	2,5	2,6	10
<i>pm0451</i>	<i>Hypothetical</i>	2,3	2,1	2,2	6
<i>yfeA</i>	<i>Iron transporter, periplasmic-binding protein</i>	2,3	2,3	2,2	10
<i>yfeB</i>	<i>Iron(III) dicitrate transport ATP-binding protein</i>	2,3	2,2	2,2	10
<i>fecB</i>	<i>Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein</i>	2,2	2,3	2,1	10
<i>yfeD</i>	<i>Iron (chelated) transporter, permease protein</i>	2,1	1,7	2,2	10
<i>pm0448</i>	<i>Hypothetical</i>	2,1	1,9	2,0	6
<i>yfeC</i>	<i>Iron ABC transporter, permease protein, putative</i>	2,1	1,6	2,1	10
<i>fecE</i>	<i>Iron(III) dicitrate transport protein, membrane-bound</i>	2,0	2,0	1,6	10
<i>fpbA</i>	<i>Iron binding protein FbpA precursor</i>	2,0	2,5	2,5	10
<i>fecD</i>	<i>Iron(III) dicitrate transport system permease</i>	1,9	1,6	1,8	10
<i>hugZ</i>	<i>Protein possible involved in haem detoxification</i>	1,8	1,9	1,9	3
<i>pm1473</i>	<i>ABC transporter, ATP-binding protein, putative</i>	1,8	1,8	1,7	10
<i>fecC</i>	<i>Iron(III) dicitrate transport system permease</i>	1,8	1,6	1,7	10
<i>hugX</i>	<i>Protein possible involved in haem detoxification</i>	1,7	1,7	1,9	3
<i>pm1080</i>	<i>Hypothetical</i>	1,7	1,5	1,3	6
<i>pm0127</i>	<i>Hypothetical</i>	1,7	1,5	1,5	6
<i>resA</i>	<i>Cytochrome C biogenesis protein, putative</i>	1,7	1,6	2,0	5
<i>pm1078</i>	<i>Haemin binding receptor</i>	1,6	1,6	1,4	10
<i>cydD</i>	<i>Transport ATP binding protein</i>	1,6	1,4	1,7	10
<i>pm0449</i>	<i>Hypothetical</i>	1,6	1,3	1,5	6
<i>pm0679</i>	<i>Hypothetical</i>	1,5	1,4	1,5	6
<i>tcmP</i>	<i>Tetracenomycin C synthesis protein</i>	1,4	1,7	2,1	6
<i>pm0450</i>	<i>ABC transporter, hypothetical</i>	1,4	1,5	1,7	10
<i>pm1079</i>	<i>FecCD-family membrane transport</i>	1,3	1,0	1,1	10
<i>fbpB</i>	<i>Transmembrane permease, putative</i>	1,2	0,9	1,0	10
<i>pm0185</i>	<i>6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase</i>	1,2	1,5	1,5	3
<i>tonB</i>	<i>TonB protein</i>	1,2	0,7	1,0	10
<i>pm0092</i>	<i>Sigma (54) modulation protein, putative</i>	1,1	2,4	2,6	9
<i>htpG</i>	<i>Heat shock protein</i>	1,1	1,1	1,1	7
<i>rbsA2</i>	<i>Ribose transport ATP-binding protein</i>	1,0	1,0	1,1	10
<i>hgbA</i>	<i>Putative haemoglobin receptor</i>	1,0	1,2	1,0	10
<i>exbD</i>	<i>Biopolymer transport protein</i>	1,0	0,9	0,8	10
<i>lldD</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	0,9	1,1	1,0	5
<i>mdh2</i>	<i>Malate dehydrogenase, putative</i>	0,9	1,2	1,3	5
<i>oapA</i>	<i>Opacity associated protein</i>	0,9	1,1	1,2	2
<i>nrdB</i>	<i>Ribonucleoside diphosphate reductase, beta chain</i>	0,9	1,1	1,2	4
<i>pm0184</i>	<i>Hypothetical</i>	0,8	1,0	1,3	6
<i>htrA</i>	<i>Heat shock protein, periplasmic serine protease,</i>	0,8	1,2	1,4	7

Ergebnisse

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	Signalwert ³			FG ⁴
		15 min	30 min	60 min	
	<i>putative</i>				
clpB	<i>ATP-dependent protease, ATPase subunit</i>	0,8	1,1	1,4	7
pm0612	<i>Hypothetical</i>	0,8	1,6	2,2	6
putA	<i>Bifunctional protein, proline dehydrogenase</i>	0,8	1,0	1,2	5
<i>tnaA</i>	<i>Tryptophanase</i>	0,7	1,7	2,0	1
pm1190	<i>Hypothetical</i>	0,7	1,1	0,9	6
<i>pm0297</i>	<i>Hypothetical</i>	0,7	1,2	1,6	6
pm0614	<i>Hypothetical</i>	0,7	1,1	1,3	6
pm0186	<i>Hypothetical</i>	0,7	0,8	1,0	6
pm0613	<i>Hypothetical</i>	0,6	1,1	1,3	6
<i>pm0758</i>	<i>Hypothetical</i>	0,6	1,2	1,7	6
<i>rbsB</i>	<i>D-allose binding periplasmic protein</i>	0,6	0,7	1,5	10
<i>pm1077</i>	<i>Lipoprotein</i>	0,6	1,0	1,0	2
glnD	<i>Uridyl transferase</i>	0,6	0,7	1,2	1
pm0626	<i>Hypothetical</i>	0,6	0,8	1,1	6
oppA	<i>Oligopeptide-binding protein precursor</i>	0,5	1,0	2,1	10
glpR	<i>Transcription regulator, putative</i>	0,5	0,7	1,2	9
pm0711	<i>Hypothetical</i>	0,5	0,9	1,2	6
pm0326	<i>Soluble lytic murein transglycosylase, putative</i>	0,5	0,6	1,3	2
pm1566	<i>Hypothetical</i>	0,5	0,7	1,1	6
<i>arsC</i>	<i>Arsenate reductase, putative</i>	0,4	0,7	1,0	3
araD	<i>L-ribulose-phosphate 4-epimerase</i>	0,4	0,6	1,1	5
pm0366	<i>Hypothetical</i>	0,4	0,7	1,0	6
pm0817	<i>Hypothetical</i>	0,4	1,2	1,2	6
<i>pm0659</i>	<i>Hypothetical</i>	0,3	0,6	1,0	6
<i>tfoX</i>	<i>Transformation protein, putative</i>	0,3	1,2	0,9	3
moaE	<i>Molybdopterin-converting factor subunit 2</i>	0,3	0,8	1,5	3
grx	<i>Glutaredoxin</i>	0,3	0,4	1,1	4
ilvE	<i>Branched-chain amino acid aminotransferase</i>	0,3	0,5	1,5	1
pm0472	<i>Immunogenic protein, putative</i>	0,2	0,7	1,1	6
pm1245	<i>Hexulose-6-phosphate isomerase, putative</i>	0,2	0,7	1,2	5
<i>pm1246</i>	<i>Hexulose-6-phosphate synthase, putative</i>	0,2	1,0	0,7	5
moaC	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis protein C</i>	0,2	0,5	1,1	3
<i>acsA</i>	<i>Acetyl CoA synthetase</i>	0,2	1,0	1,9	5
<i>pm1277</i>	<i>Sugar binding protein, putative</i>	0,2	0,6	1,2	10
<i>pm0064</i>	<i>Hypothetical</i>	0,1	0,8	1,0	6
<i>pm1478</i>	<i>Hypothetical</i>	0,0	-0,1	1,0	6
pm1347	<i>Membrane protein, putative</i>	0,0	0,4	1,1	2
<i>tnaB</i>	<i>Tryptophan specific transport ptortin</i>	-0,1	0,5	1,1	10
pm0718	<i>Sodium-dependent transporter, putative</i>	-0,3	0,3	1,0	10
moaD	<i>Molybdopterin-converting factor subunit 1</i>	-0,4	0,5	1,2	3
gcvA	<i>Glycine cleavage system transcriptional activator</i>	-0,4	-0,2	1,0	9
hbpA	<i>Heam binding protein A precursor</i>	-0,7	0,6	1,9	10

¹Insgesamt wurden 93 Gene identifiziert. Fett gedruckte Namen der Gene weisen darauf hin, dass ein homologes Gen in *M. haemolytica* existiert.

²Die Annotation entspricht der von May *et al.* (2001). Wenn neuere Blast-Ergebnisse oder neuere Literatur (Bosch *et al.*, 2002a) eine andere Funktion ergaben, die mit der Funktion des entsprechenden Gens von *M. haemolytica* übereinstimmte, wurde die neue Annotation verwendet. Dies traf für die Gene *hugZ*, *hugX* und *pm0803* zu.

³Der Signalwert ist angegeben als der \log_2 des Verhältnisses (Signalwert des Medians des Zeitpunkts / Signalwert des Medians der Kontrolle). Die Signalwerte der Mediane stammen aus 3 unabhängigen Messungen der Mikroarray-Studie. In dieser Tabelle entspricht ein Signalwert von 1 einer 2fachen Veränderung in der Transkription im Vergleich zur Kontrolle.

⁴Funktionelle Gruppe; 1: Aminosäure-Biosynthese, 2: Zellwand, 3: Zelluläre Prozesse, 4: DNA-Stoffwechsel, 5: Energie-Stoffwechsel, 6: Hypothetische Funktion, 7: Protein-Faltung und -Abbau, 8: Protein-Synthese, 9: Transkription, 10: Transport und Bindung (siehe auch Abb. 14).

Tabelle 11 Gene von *P. multocida* mit verminderter Transkription bei Eisenmangel

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	Signalwert ³			FG ⁴
		15 min	30 min	60 min	
napF	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-5,3	-4,6	-4,3	5
pepT	<i>Peptidase T</i>	-5,1	-4,6	-5,1	7
nrfA	<i>Nitrite reductase, cytochrome C552</i>	-4,5	-4,8	-4,4	5
napD	<i>NapD protein</i>	-4,0	-4,3	-3,5	7
napA	<i>Periplasmic nitrate reductase precursor</i>	-4,0	-3,8	-3,6	5
nrfB	<i>Nitrite reductase, cytochrome C-type</i>	-3,9	-3,9	-3,8	5
napH	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-3,8	-4,1	-3,0	5
nrfC	<i>Nitrite reductase, Fe-S protein</i>	-3,7	-4,3	-4,4	5
napC	<i>Cytochrome C-type protein</i>	-3,6	-3,3	-2,7	5
napB	<i>Periplasmic nitrate reductase, cytochrome C-type</i>	-3,4	-3,8	-3,1	5
nrfD	<i>Nitrite reductase, transmembrane protein</i>	-3,3	-3,5	-3,8	5
napG	<i>Ferredoxin-type protein</i>	-2,8	-3,1	-2,8	5
ccmA	<i>Haem exporter ATP-binding protein A</i>	-2,7	-2,9	-2,7	10
ompW	<i>Outer membrane protein OmpW precursor</i>	-2,7	-3,1	-2,3	10
arcA	<i>Aerobic respiration control protein</i>	-2,3	-2,0	-2,2	3
torC	<i>Pentahemic C-type cytochrome</i>	-1,9	-2,0	-2,2	5
ccmB	<i>Haem exporter ATP-binding protein B</i>	-1,7	-2,4	-1,9	10
<i>deuC</i>	<i>Hypothetical</i>	-1,7	-2,1	-1,3	6
pm1211	<i>Hypothetical</i>	-1,7	-2,7	-3,2	6
frdB	<i>Fumarate reductase, iron sulfur protein</i>	-1,6	-1,6	-1,3	5
pm1855	<i>Hypothetical</i>	-1,6	-2,1	-1,8	6
bioD1	<i>Dethiobiotin synthase</i>	-1,6	-1,5	-1,3	3
torD	<i>Trimethylamine-n-oxide oxidoreductase</i>	-1,5	-1,7	-1,9	5
ccmD	<i>Haem exporter ATP-binding protein D</i>	-1,5	-1,5	-1,2	10
merT	<i>Mercuric ion transport protein, putative</i>	-1,5	-2,5	-3,3	10
<i>ccmC</i>	<i>Haem exporter ATP-binding protein C</i>	-1,5	-1,8	-1,5	10
torA	<i>Trimethylamine-n-oxide reductase precursor</i>	-1,5	-1,6	-2,0	5
ccmE	<i>Cytochrome C biosynthesis</i>	-1,5	-1,4	-1,2	5
pm1854	<i>Iron sulfur protein, putative</i>	-1,5	-1,9	-1,9	5
ccmF	<i>Cytochrome C-type biogenesis</i>	-1,5	-1,2	-1,1	5
<i>merP</i>	<i>Mercuric reductase, putative mercuric ion scavenger</i>	-1,5	-2,3	-2,9	10
<i>cvgSY</i>	<i>Histidine kinase-phosphate acceptor regulatory protein</i>	-1,4	-1,4	-1,2	3
cdd	<i>Cytidine deaminase</i>	-1,4	-1,5	-0,5	4
<i>yhiA</i>	<i>Cytochrome C peroxidase</i>	-1,4	-2,0	-1,1	3
abc	<i>ATP-binding protein, ABC transporter</i>	-1,3	-1,1	-1,2	10
pm0761	<i>Hypothetical</i>	-1,3	-1,6	-1,3	6
frdD	<i>Fumarate reductase, 13 kDa hydrophobic protein</i>	-1,3	-1,3	-1,1	5
pm0074	<i>Formate transporter, putative</i>	-1,3	-1,0	-1,2	10
rec2	<i>Recombination protein 2</i>	-1,2	-0,7	-0,3	3
hepA	<i>Helicase, RNA polymerase associated protein</i>	-1,2	-1,4	-1,7	9
plpB	<i>Outer membrane lipoprotein 2 precursor</i>	-1,1	-0,9	-0,1	2
frdC	<i>Fumarate reductase, 15 kDa hydrophobic protein</i>	-1,1	-1,3	-1,0	5
frdA	<i>Fumarate reductase, flavoprotein subunit</i>	-1,1	-1,1	-1,0	5
pm1853	<i>Hypothetical</i>	-1,1	-1,2	-1,3	6
metX	<i>S-adenosylmethionine synthetase</i>	-1,0	-0,9	-1,1	3
<i>nspC</i>	<i>Carboxynorspermidine decarboxylase</i>	-1,0	-1,2	-1,7	3
pm1335	<i>Hypothetical</i>	-0,9	-0,8	-1,1	6
pm0091	<i>Hypothetical</i>	-0,9	-1,2	-1,2	6
pcnB	<i>Poly(A) polymerase</i>	-0,8	-1,1	-1,7	9
pm1113	<i>Hypothetical</i>	-0,8	-1,2	-0,9	6
pm0687	<i>Hypothetical</i>	-0,8	-1,3	-1,2	6

Name des Gens ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	Signalwert ³			FG ⁴
		15 min	30 min	60 min	
<i>cydB</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II	-0,8	-1,2	-1,1	5
cvpA	Colicin V production protein	-0,7	-1,5	-1,3	3
cydA	Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit I	-0,7	-1,1	-1,0	5
nqrE	NADH:ubiquinone oxidoreductase	-0,7	-1,0	-0,7	5
<i>ribB</i>	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	-0,7	-1,0	-1,0	3
lspA	Lipoprotein signal peptidase	-0,7	-1,1	-1,1	7
pm0871	Hypothetical	-0,7	-1,2	-1,5	10
brnQ	Branched-chain amino acid carrier	-0,7	-1,2	-1,3	10
folK	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine	-0,7	-1,2	-1,2	3
lspB1	Haemolysin accessory protein	-0,7	-1,1	-1,2	3
infB	Translation initiation factor 2	-0,7	-0,7	-1,1	8
<i>pm0972</i>	Hypothetical	-0,6	-1,1	-0,9	6
mrp	ATP-binding protein	-0,6	-1,2	-0,6	6
dppC	Dipeptide transport system, permease protein	-0,6	-1,2	-1,3	10
<i>pm1307</i>	Hypothetical	-0,6	-1,0	-1,0	6
pm1791	Transport protein, putative	-0,6	-1,2	-1,7	10
<i>uhpB</i>	Hexose phosphate transport system regulatory protein	-0,6	-1,0	-1,3	3
pm1804	Hypothetical	-0,5	-0,9	-1,3	6
<i>dcuC</i>	C4-dicarboxylate anaerobic carrier	-0,5	-0,9	-1,2	10
pm0349	Hypothetical	-0,5	-1,1	-1,2	6
deaD	ATP-dependent RNA helicase	-0,4	-0,9	-1,0	8
<i>pm0350</i>	Hypothetical	-0,4	-1,0	-0,8	6
trmA	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	-0,4	-0,9	-1,5	8
phyA	Capsule biosynthetic locus	-0,3	-1,8	-1,2	2
<i>pm0777</i>	Glycosyl transferase, putative	-0,2	-1,5	-1,4	2
phyB	Capsule biosynthetic locus	-0,1	-1,4	-1,2	2
hexA	Capsule biosynthetic locus	-0,1	-1,1	-1,3	2
hexB	Capsule biosynthetic locus	-0,1	-1,4	-1,2	2
<i>hyaE</i>	Capsule biosynthetic locus	0,1	-1,1	-0,9	2

¹Insgesamt wurden 80 Gene identifiziert.

²Die Annotation entspricht der von May *et al.* (2001). Wenn neuere Blast-Ergebnisse oder neuere Literatur (Bosch *et al.*, 2002a) eine andere Funktion ergaben, die mit der Funktion des entsprechenden Gens von *M. haemolytica* übereinstimmte, wurde die neue Annotation verwendet. Dies traf für die Gene *napD*, *pm1853* und *pm1211* zu. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 10.

3.3 Verifizierung der Mikroarray-Daten

Zur Verifizierung der Mikroarray-Daten wurde der Transkriptionsverlauf ausgewählter Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida* (Tabelle 35 im Anhang) mit der Northern-Blot-Analyse und der *real time* PCR nachgewiesen. Als konstitutiv transkribiertes Kontroll-Gen wurde *recA* gewählt, das für die Rekombinase A kodiert. Das Gen *recA* zeigte in der Mikroarray-Studie sowohl bei *M. haemolytica* als auch bei *P. multocida* nur leichte, nicht signifikante Transkriptionsschwankungen. Bei *M. haemolytica* lag der über alle 12 Mikroarrays gemittelte Signalwert bei 224 ± 27 RFU und bei *P. multocida* bei 138 ± 26 RFU (einzelne Signalwerte in Tabelle 36 im Anhang). In einer vergleichbaren Mikroarray-

Studie mit *P. multocida* bei Wachstum unter Eisenmangel (Paustian *et al.*, 2001) konnte ebenfalls keine veränderte Transkription für *recA* beobachtet werden.

3.3.1 Qualitative Verifizierung mit der Northern-Blot-Analyse

Für die qualitative Verifizierung der Mikroarray-Daten mit der Northern-Blot-Analyse wurden neben dem Kontroll-Gen *recA* die Gene *fbpA* und *hmbR2* (bei *M. haemolytica*) bzw. *hmbR* (bei *P. multocida*) verwendet. Die Gene *fbpA* und *hmbR2* bzw. *hmbR* wurden ausgewählt, da sie für Proteine kodieren, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind und in der Mikroarray-Studie eine eisenabhängige verstärkte Transkription zeigten (Abb. 15). Das Gen *fbpA* kodiert für das periplasmatische Transportprotein *ferric binding protein A* (FbpA). *HmbR2* bzw. *hmbR* kodieren für einen Hämoglobin-Rezeptor der äußeren Membran. *FbpA* zeigte in der Mikroarray-Studie sowohl bei *M. haemolytica* als auch bei *P. multocida* bereits zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle in Vollmedium) mit 130-240 RFU eine Transkription. Nach 15, 30 und 60 min Wachstum unter Eisenmangel zeigte es eine mehr als 4fach verstärkte Transkription (Abb. 15). Die Gene der Hämoglobin-Rezeptoren zeigten in der Mikroarray-Studie zum Zeitpunkt 0 min mit maximal 41 RFU eine kaum detektierbare Transkription und zu den Zeitpunkten unter Eisenmangel eine verstärkte Transkription (mehr als 16fach bei *M. haemolytica* und mehr als 4fach bei *P. multocida*; siehe Abb. 15).

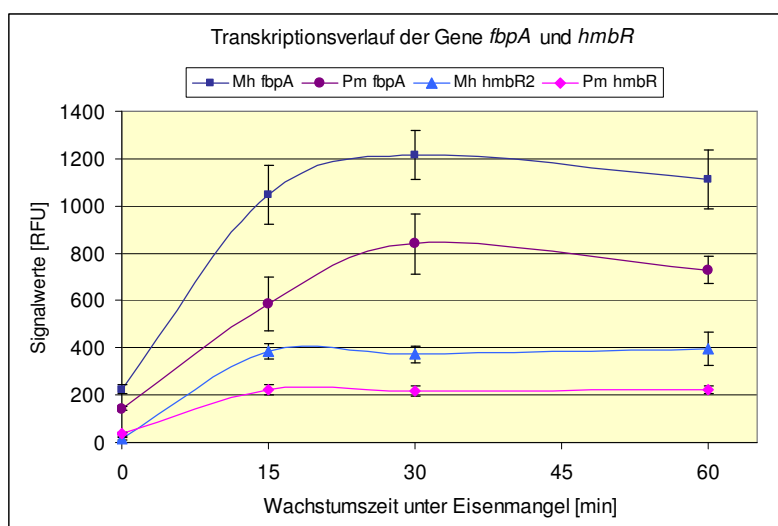


Abb. 15 Transkriptionsverlauf der Gene *fbpA* und *hmbR2* bzw. *hmbR* von *M. haemolytica* (Mh) und *P. multocida* (Pm) bei Eisenmangel *in vitro*

Die dargestellten Signalwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$) wurden mittels Mikroarray-Analyse bei Wachstum in Vollmedium (Kontrolle = 0 min) und nach 15, 30 und 60 min Wachstum unter Eisenmangel ermittelt. Die Gene zeigten bei Wachstum unter Eisenmangel eine verstärkte Transkription gegenüber dem Wachstum in Vollmedium (0 min). Der Transkriptionsverlauf dieser Gene konnte mit der Northern-Blot-Analyse verifiziert werden (Abb. 16). Die einzelnen Signalwerte sind im Anhang in Tabelle 36 aufgeführt.

Ergebnisse

Für beide Bakterien konnte der Transkriptionsverlauf der Gene *recA*, *fbpA* und *hmbR2* bzw. *hmbR*, der mit der Mikroarray-Studie ermittelt wurde (Abb. 15), auch mit der Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 16). Für das Gen *recA* beider Bakterien war eine gleich bleibende Transkription über die Kontrolle und die 3 Zeitpunkte unter Eisenmangel zu sehen. Für die Gene *fbpA*, *hmbR2* und *hmbR* war die Induktion der Transkription bei Eisenmangel zu sehen. Das Transkript von *fbpA* war zum Zeitpunkt 0 min nur in geringen Mengen vorhanden, während die Transkription zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min vergleichsweise stark war. Das Gen *hmbR2* von *M. haemolytica* war zum Zeitpunkt 0 min unterhalb des Signalwertes von 30 RFU transkribiert und das Gen *hmbR* von *P. multocida* mit maximal 41 RFU nur leicht. Bei Wachstum von 15, 30 und 60 min unter Eisenmangel wurden jedoch beide Gene deutlich stärker transkribiert. Im Northern Blot wurden für die beiden Gene *hmbR2* und *hmbR* neben den erwarteten Banden von 2429 bp (*hmbR2*) und 2355 b (*hmbR*) eine zweite Bande von etwa 1500 b detektiert (Abb. 16).

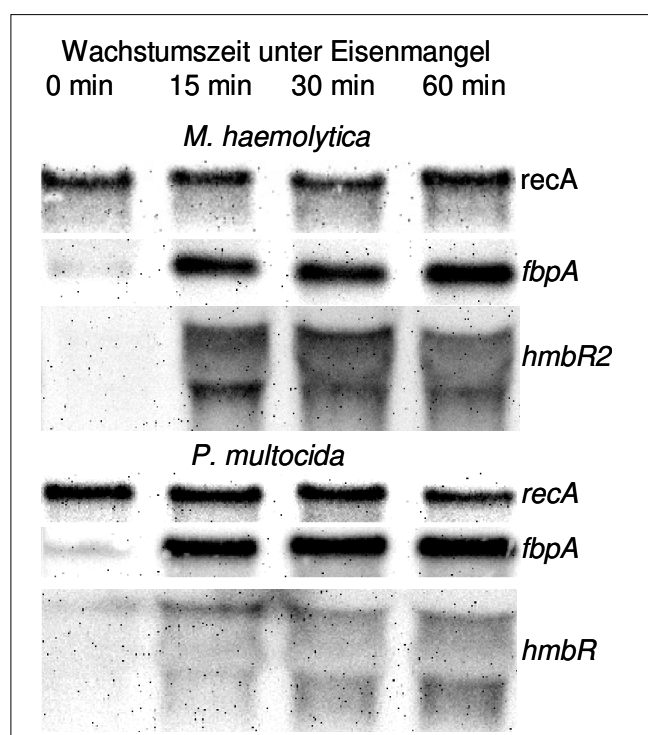


Abb. 16 Verifizierung der Mikroarray-Daten mittels Northern-Blot-Analyse

Der bei der Mikroarray-Analyse ermittelte Transkriptionsverlauf der Gene *recA*, *fbpA* und *hmbR2* bzw. *hmbR* von *M. haemolytica* und *P. multocida* konnte mit der Northern-Blot-Analyse bestätigt werden. *RecA* zeigte über den gesamten Zeitverlauf eine konstante Transkription, während *fbpA*, *hmbR2* bzw. *hmbR* bei Wachstum unter Eisenmangel zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min stark induziert wurden. Für die beiden Gene *hmbR2* und *hmbR* wurden neben den erwarteten Banden von 2429 bp (*hmbR2*) und 2355 b (*hmbR*) eine zweite Bande von etwa 1500 b detektiert.

3.3.2 Quantitative Verifizierung mittels *real time* PCR

Die qualitative Bestätigung der Mikroarray-Daten mit der Northern-Blot-Analyse wurde durch eine quantitative Analyse mittels *real time* PCR ergänzt. Dies wurde für einige zusätzliche Gene von *M. haemolytica* durchgeführt, um auch die Höhe der transkriptionellen Induktion bei Wachstum unter Eisenmangel zu verifizieren. Der Nachweis der veränderten Transkription mittels quantitativer *real time* PCR wurde für die Gene *recA*, *fbpA*, *hmbR2* (siehe auch 3.3.1), *frpB*, *hmbR1* und *lldD* untersucht. Das Gen *frpB* kodiert für einen putativen Enterobaktin-Rezeptor der äußeren Membran und das Gen *hmbR1* für einen zweiten Hämoglobin-Rezeptor der äußeren Membran. *LldD* kodiert für das cytosolische Protein L-Laktat-Dehydrogenase, das vermutlich nicht direkt in die Eisenaufnahme involviert ist, aber in der Mikroarray-Studie bei Wachstum unter Eisenmangel mehr als 20fach verstärkt transkribiert wurde (Abb. 17).

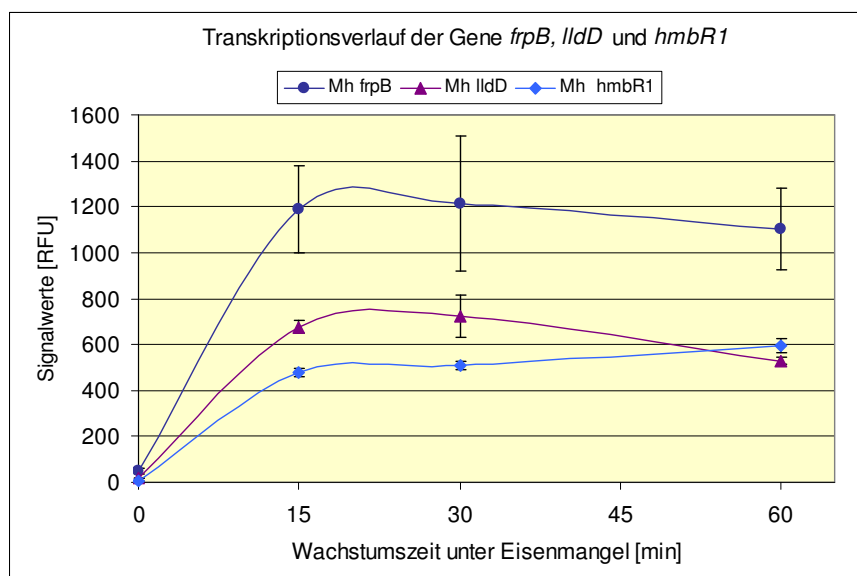


Abb. 17 Transkriptionsverlauf der Gene *frpB*, *lldD* und *hmbR1* von *M. haemolytica* (Mh) bei Eisenmangel *in vitro*

Die dargestellten Signalwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$) wurden mittels Mikroarray-Analyse bei Wachstum in Vollmedium (Kontrolle = 0 min) und nach 15, 30 und 60 min Wachstum unter Eisenmangel ermittelt. Die Gene zeigten bei Wachstum unter Eisenmangel eine verstärkte Transkription gegenüber dem Wachstum in Vollmedium (0 min). Der Transkriptionsverlauf dieser Gene konnte mit der quantitativen *real time* PCR verifiziert werden (Tabelle 12). Die einzelnen Signalwerte sind im Anhang in Tabelle 36 aufgeführt.

Die konstitutive Transkription von *recA* sowie die verstärkte Transkription der Gene *hmbR1*, *hmbR2*, *fbpA*, *frpB* und *lldD* konnte mit der quantitativen *real time* PCR nachgewiesen werden. In Abb. 18 ist als Beispiel die Amplifikation des PCR-Produkts von *frpB* aus *M. haemolytica* aus den Proben der Mikroarray-Studie dargestellt. Die Korrelation der Amplifikation wurde dadurch gezeigt, dass die in zwei verschiedenen Konzentrationen

Ergebnisse

mit 10fachem Unterschied eingesetzten Proben in den erwarteten Zyklus-Abständen von 3,3 messbar amplifiziert wurden. Die verstärkte Transkription des Gens bei Wachstum unter Eisenmangel ist deutlich zu sehen, da die PCR-Produkte vom Zeitpunkt 0 min (Wachstum in Vollmedium) in einem späteren Zyklus entstanden als die PCR-Produkte von den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min Wachstum unter Eisenmangel. Ebenfalls ist zu sehen, dass die Transkription des Gens *fbpB* bei Wachstum unter Eisenmangel zu den drei untersuchten Zeitpunkten gleich stark war, was durch die Amplifikation bei gleichen Zyklen visualisiert wird.

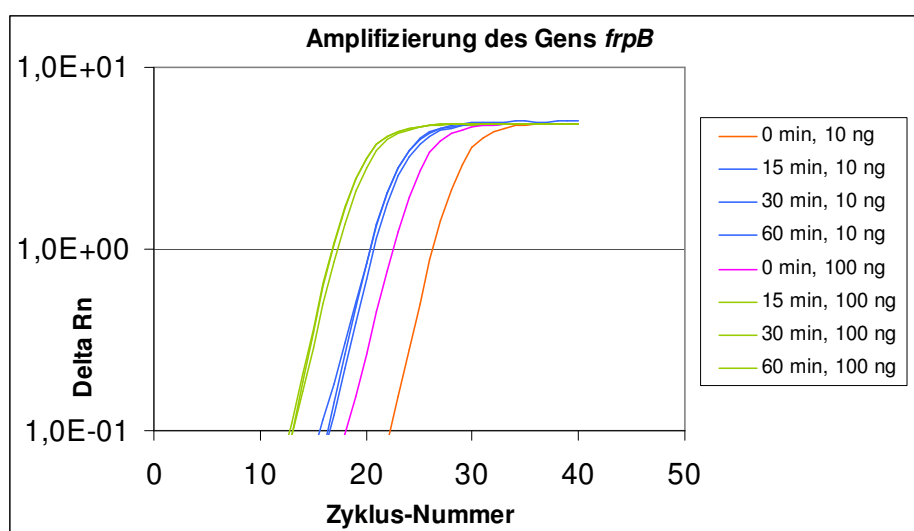


Abb. 18 Verlauf der Amplifizierung des Gens *frpB* von *M. haemolytica*

Die Proben für die quantitative *real time* PCR entstammen den *in vitro*-Kulturen in Vollmedium und bei Eisenmangel, die auch für die Mikroarray-Analyse verwendet wurden. Es wurden jeweils 3 unabhängige Messungen durchgeführt, von denen jeweils eine hier abgebildet ist. Die Proben wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen mit 10fachem Unterschied (10 ng und 100 ng) eingesetzt und zeigen entsprechende Abstände von 3,3 Zyklen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Proben vom Zeitpunkt 0 min später amplifiziert wurden als die Proben der Zeitpunkte 15, 30 und 60 min, die mit gleicher Stärke amplifiziert wurden. Die spätere Amplifizierung beruht auf der geringeren Menge an *template* in der Probe.

Delta Rn: Normalisiertes Reporter-Signal abzüglich der Basislinie

Die mit den beiden unterschiedlichen Methoden der Mikroarray-Analyse und der *real time* PCR ermittelten Faktoren der Transkriptionsänderung sind in Tabelle 12 aufgeführt. Für alle Gene wurde bei Wachstum unter Eisenmangel im Vergleich zur Kontrolle in Vollmedium eine verstärkte Transkription mit beiden Methoden nachgewiesen, so dass die Mikroarray-Studie durch die mit der *real time* PCR gewonnenen Daten verifiziert werden konnte. Die ermittelten Faktoren der verstärkten Transkription unterschieden sich bei den beiden Methoden. Für das Gen *hmbR1* wurde mit der Mikroarray-Analyse eine Verstärkung um einen größeren Faktor ermittelt als mit der *real time* PCR, bei dem Gen

hmbR2 war der Faktor der Transkriptionsveränderung etwa gleich. Bei den Genen *fbpA*, *frpB* und *lldD* wurde mit der *real time* PCR eine größere Änderung der Induktion ermittelt als mit der Mikroarray-Analyse.

Tabelle 12 Quantitative Verifizierung der Mikroarray-Daten mittels *real time* PCR

Gen	Methode	Faktor der Transkriptionsänderung		
		15 min	30 min	60 min
<i>hmbR1</i>	Mikroarray	104	136	137
	<i>real time</i> PCR	19	21	25
<i>hmbR2</i>	Mikroarray	25	29	27
	<i>real time</i> PCR	21	22	19
<i>fbpA</i>	Mikroarray	3	5	5
	<i>real time</i> PCR	12	11	13
<i>frpB</i>	Mikroarray	18	21	18
	<i>real time</i> PCR	73	50	34
<i>lldD</i>	Mikroarray	32	38	25
	<i>real time</i> PCR	120	92	61

*Der Faktor der Transkriptionsänderung wurde mit folgender Formel berechnet, die eine Normalisierung auf das Kontroll-Gen *recA* beinhaltet: Faktor der Transkriptionsänderung = Ziel-Gen (Zeitpunkt/Kontrolle) / Kontroll-Gen *recA* (Zeitpunkt/Kontrolle). Bei den Mikroarrays wurde mit den Signalwerten (RFU) gerechnet, bei der *real time* PCR mit der Anzahl an Molekülen.

3.4 Transkriptomvergleich von *M. haemolytica* und *P. multocida* bei Eisenmangel

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verwandten Pathogene *M. haemolytica* und *P. multocida* bei Eisenmangel *in vitro* zu untersuchen, wurden die eisenabhängigen Transkriptome der beiden Bakterien (Kapitel 3.1 und 3.2) miteinander verglichen. Von den 1424 homologen Genen von *M. haemolytica* und *P. multocida* (Kapitel 2.2) zeigten 162 Gene (11,4%) bei Wachstum unter Eisenmangel eine veränderte Transkription (Abb. 19).

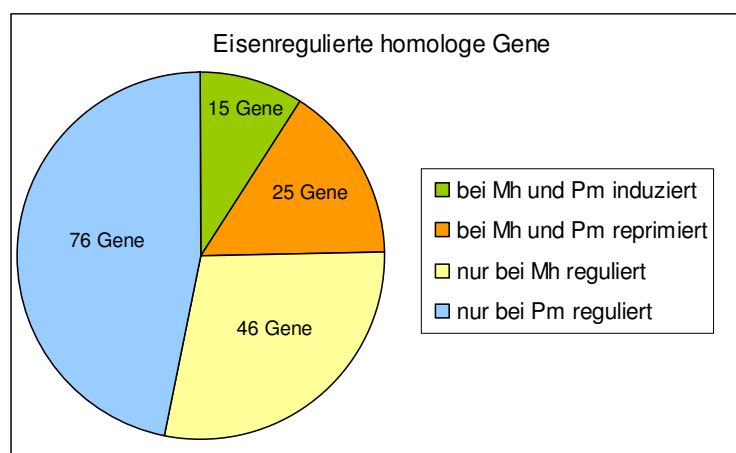


Abb. 19 *In vitro* eisenregulierte homologe Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida*
Insgesamt 162 der 1424 homologen Gene wurden mittels Mikroarray-Analyse als eisenreguliert identifiziert.

Ergebnisse

Bei Wachstum unter Eisenmangel zeigten 15 der homologen regulierten Gene bei beiden Pathogenen eine verstärkte Transkription (Tabelle 13). Diese Gene kodieren für Eisentransportproteine wie z.B. einen Hämoglobinrezeptor, den Energie liefernden Komplex TonB-ExbBD, sowie die ABC-Transportsysteme YfeABCD und FbpAB. Die Gene *exbB* und *fbpC* von *P. multocida* waren zu einem bzw. allen Zeitpunkten signifikant gegenüber der Kontrolle verändert. Ihre Transkription erreichte jedoch keinen 2fachen Unterschied zur Kontrolle, weshalb sie in Tabelle 13 nicht aufgeführt sind. Das Gen *hugZ*, dessen kodiertes Protein wahrscheinlich an der Detoxifizierung von Häm beteiligt ist (Bosch *et al.*, 2002a), wurde ebenfalls bei beiden Bakterien verstärkt transkribiert. Das Gen *lldD*, dessen kodiertes Protein L-Laktat-Dehydrogenase vermutlich nicht direkt an der Eisenaufnahme beteiligt ist, wurde ebenso bei beiden Pathogenen verstärkt transkribiert wie drei homologe Gene, deren kodierte Proteine noch nicht annotiert werden konnten (*mh0741/pm0064*, *mh0733/pm0612*, *mh0368/pm0679*).

Tabelle 13 Induzierte homologe Gene bei Wachstum unter Eisenmangel

Gen(e) ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	FG ³
<i>exbD</i>	<i>Biopolymer transport protein</i>	10
<i>fbpA</i>	<i>Periplasmic iron binding protein A precursor</i>	10
<i>fbpB</i>	<i>Putative transmembrane iron III permease</i>	10
<i>hmbR2</i>	<i>Haemoglobin receptor HmbR2</i>	10
<i>htrA</i>	<i>Possible periplasmic serine protease precursor</i>	7
<i>hugZ</i>	<i>Possible protein involved in haem detoxification</i>	3
<i>lldD</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	5
<i>mh0368/pm0679</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	6
<i>mh0733/pm0612</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	6
<i>mh0741/pm0064</i>	<i>Conserved protein of unknown function</i>	6
<i>tonB</i>	<i>TonB protein</i>	10
<i>yfeA</i>	<i>ABC transport system, periplasmic protein</i>	10
<i>yfeB</i>	<i>ABC transport system, ATP-binding protein</i>	10
<i>yfeC</i>	<i>ABC transport system, permease protein</i>	10
<i>yfeD</i>	<i>ABC transport system, permease protein</i>	10

¹Insgesamt wurden 15 Gene identifiziert

²Tabelle 8 entnommen

³Funktionelle Gruppe, Tabelle 8 entnommen

Die Anzahl der homologen Gene, die bei Wachstum unter Eisenmangel bei beiden Bakterien eine verminderte Transkription zeigten, betrug 25 (Tabelle 14). Von diesen Genen kodieren 20 für Proteine des Energie-Stoffwechsels, von denen wiederum 15 in den heteromeren Komplexen der Nitrat-Reduktase (NapABCDEFGH), der Nitrit-Reduktase (NrfABCD) und der Fumarat-Reduktase (FrdABCD) der anaeroben Atmung enthalten sind.

Tabelle 14 Reprimierte homologe Gene bei Wachstum unter Eisenmangel

Gen(e) ¹	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins ²	FG ³
<i>ccmF</i>	<i>Cytochrome C-type biogenesis protein</i>	5
<i>cydA</i>	<i>Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit</i>	5
<i>deaD</i>	<i>ATP-dependent RNA helicase</i>	8
<i>frdA</i>	<i>Fumarate reductase, flavoprotein subunit</i>	5
<i>frdB</i>	<i>Fumarate reductase, iron-sulfur protein</i>	5
<i>frdC</i>	<i>Fumarate reductase</i>	5
<i>frdD</i>	<i>Fumarate reductase</i>	5
<i>merT</i>	<i>Mercuric ion transport protein</i>	10
<i>mh0969/pm1211</i>	<i>Possible secreted cysteine protease</i>	7
<i>mh0987/pm1853</i>	<i>Glycolate oxidase</i>	3
<i>mh0988/pm1854</i>	<i>Possible iron-sulfur binding reductase</i>	5
<i>mh0989/pm1855</i>	<i>Possible conserved iron-sulfur protein</i>	6
<i>napA</i>	<i>Periplasmic nitrate reductase precursor</i>	5
<i>napB</i>	<i>Cytochrome C-type protein precursor</i>	5
<i>napC</i>	<i>Cytochrome C-type protein</i>	5
<i>napD</i>	<i>NapD protein</i>	5
<i>napF</i>	<i>Ferredoxin-type protein</i>	5
<i>napG</i>	<i>Ferredoxin-type protein</i>	5
<i>napH</i>	<i>Ferredoxin-type protein</i>	5
<i>nqrE</i>	<i>Na-NQR complex subunit 5</i>	5
<i>nrfA</i>	<i>Cytochrome D552 precursor</i>	5
<i>nrfB</i>	<i>Cytochrome c-type protein precursor</i>	5
<i>nrfC</i>	<i>Nitrite reductase, Fe-S protein</i>	5
<i>nrfD</i>	<i>Nitrite reductase, transmembrane protein</i>	5
<i>torC</i>	<i>Cytochrome c-type protein</i>	5

¹Insgesamt wurden 25 Gene identifiziert

²Tabelle 9 entnommen

³Funktionelle Gruppe, Tabelle 9 entnommen

Der größte Anteil der homologen regulierten Gene war jedoch bei beiden Pathogenen unterschiedlich reguliert (Abb. 19). Die Änderung der Transkription dieser homologen Gene fiel verschieden stark aus. Bei einigen Genen war sie ebenfalls signifikant, erreichte aber den 2fachen Unterschied zur Kontrolle nicht, wie z.B. bei den 4 Genen *ccmABCD* von *P. multocida*. *CcmABCD* kodieren für verschiedene ATP-Bindungsproteine von Häm-Exportern und waren vermindert transkribiert (Tabelle 10), während die homologen Gene

von *M. haemolytica* keine veränderte Transkription zeigten. Bei anderen Genen war der Unterschied stärker; sie wurden z.B. nur ganz schwach in die gleiche Richtung verändert transkribiert (verstärkt oder vermindert) oder aber in die andere Richtung. Es kam jedoch nicht vor, dass eine entgegengesetzte Veränderung den Faktor 2 erreichte.

Einige homologe Gene, deren Annotation auf eine Funktion bei der Eisenaufnahme oder im Eisenhaushalt hinweist, wurden beim Wachstum unter Eisenmangel nicht verstärkt transkribiert. Die homologen Gene *afuABC* (*mh2569*, *mh2570*, *mh2571*; *pm0953*, *pm0956*, *pm0957*) wurden sowohl in Vollmedium als auch bei Eisenmangel bei beiden Pathogenen niedrig transkribiert (Signalwerte zwischen 30 und 100 RFU). Auch das Gen *fur*, das für den Regulator des Eisenhaushalts kodiert, wurde bei beiden Pathogenen (*mh2522/pm0352*) unter Eisenmangel nicht verstärkt transkribiert.

Unter den 63 Genen von *M. haemolytica* mit verstärkter Transkription (Tabelle 8) haben 33 kein homologes Gen in *P. multocida*. Darunter befinden sich die zu allen Zeitpunkten verstärkt transkribierten Eisentransportgene *hmbR1*, *mh0651-mh0653*, *mh0655-mh0656*, *fhuBCD*, *frpB*, die Gene *tbpAB* und 4 Gene, die noch nicht annotiert wurden (*mh0584-mh0587*). Die Gene *mh0651-mh0653* kodieren vermutlich für ein Hämin-Transport-System, das Hämin durch das Periplasma und die innere Membran transportiert. Die kodierten Proteine der Gene *mh0655-mh0656* bilden wahrscheinlich einen Hämin-Rezeptor-Komplex in der äußeren Membran. *FhuBCD* kodieren vermutlich für ein Ferrichrom-ABC-Transport-System und *frpB* für einen Enterobaktin-Rezeptor der äußeren Membran. Die Gene *tbpAB* kodieren für den Transferrin-Rezeptor-Komplex in der äußeren Membran.

Die 93 Gene von *P. multocida* mit verstärkter Transkription unter Eisenmangel (Tabelle 10) enthalten 43 Gene, die kein homologes Gen in *M. haemolytica* aufweisen. Von diesen Genen wurden 30 über den gesamten untersuchten Zeitraum verstärkt transkribiert. Unter ihnen kodieren 4 Gene für Proteine mit Funktionen in der Häm- und Hämoglobin-Aufnahme. Es sind das Gen für den Hämin-Rezeptor PfhR, das Gen *pm1078* für einen weiteren Hämin-Rezeptor, das Gen *pm0337* für ein Hämoglobin/Haptoglobin-Bindungsprotein und ein Gen (*hgbA*) für einen weiteren potentiellen Hämoglobin-Rezeptor. Auch die Gene *fecBCDE* wurden verstärkt transkribiert, die für ein Eisen-Dicitrat-Transportsystem durch das Periplasma und die innere Membran kodieren, sowie 6 Gene (*pm0448-0453*) deren kodierten Proteinen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte.

3.5 Transkription eisenregulierter Gene von *M. haemolytica* *in vivo*

3.5.1 Identifikation von eisenregulierten Gen-Transkripten *in vivo*

Mittels RT-PCR (2.4.27) wurde die *in vivo*-Transkription von 11 Genen (Tabelle 35 im Anhang) im Lungengewebe von Rindern untersucht, die mit *M. haemolytica* infiziert worden waren. Dies waren das Kontroll-Gen *recA*, das Gen *atpD* und 9 Gene mit konstant verstärkter Transkription bei Eisenmangel *in vitro* (Tabelle 8). Das Gen *atpD* wurde von Christensen *et al.* (2004) als Haushaltsgen bei den *Pasteurellaceae* bezeichnet. Es kodiert für die beta-Untereinheit der ATP-Synthase und zeigte wie *recA* in *M. haemolytica* kaum Veränderung in der Transkription beim Wachstum unter Eisenmangel. Da es in der Mikroarray-Studie mit einem Signalwert von durchschnittlich 679 RFU eine hohe, eisenunabhängige Transkription zeigte, wurde es für diese Untersuchung ausgewählt. Die 9 Gene mit verstärkter Transkription unter Eisenmangel kodieren, bis auf das für die cytosolische L-Laktat-Dehydrogenase kodierende Gen *lldD*, für Proteine, die an Transport- und Bindungsprozessen bei der Eisenaufnahme beteiligt sind (Tabelle 8). Zur Kontrolle wurde das Lungengewebe eines nicht infizierten Rindes auf gleiche Weise behandelt. In Abb. 20 ist die isolierte RNA von einem nicht infizierten Rind, von einem infizierten Rind und von *M. haemolytica* dargestellt, wobei die Unterschiede in der Größe der rRNAs von Rind und *M. haemolytica* zu sehen sind.

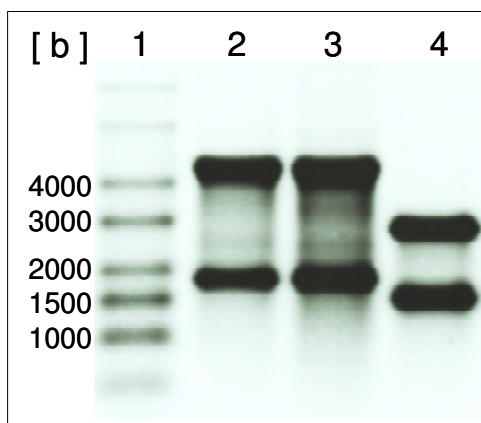


Abb. 20 RNA aus Rind und *M. haemolytica*

Spur 1: RNA-Marker; Spur 2: RNA der Gewebeprobe aus dem nicht infizierten Rind; Spur 3: RNA aus der Gewebeprobe eines infizierten Rindes, Spur 4: RNA aus *M. haemolytica*

In den Spuren 2 und 3 des RNA-Formaldehyd-Agarosegels sind die bei Säugern vorhandene 28S RNA bei 4,7 kb und die 18S RNA bei 1,8 kb zu sehen. In Spur 4 ist die bakterielle rRNA von *M. haemolytica* zu sehen. Die 23S rRNA befindet sich bei einer Größe von 2,9 kb und die 16S rRNA bei einer Größe von 1,5 kb. Der Anteil der mRNA, der nur 3% der gesamten RNA beträgt (Lewin, 1995), ist bei keiner Präparation zu sehen.

Ergebnisse

Von allen 11 Genen konnte die mRNA *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 21). Im Lungengewebe von zwei weiteren mit *M. haemolytica* infizierten Rindern wurde die RNA der Gene *recA* und *lldD* ebenfalls mittels RT-PCR nachgewiesen. Dies ist in Abb. 21 nicht dargestellt.

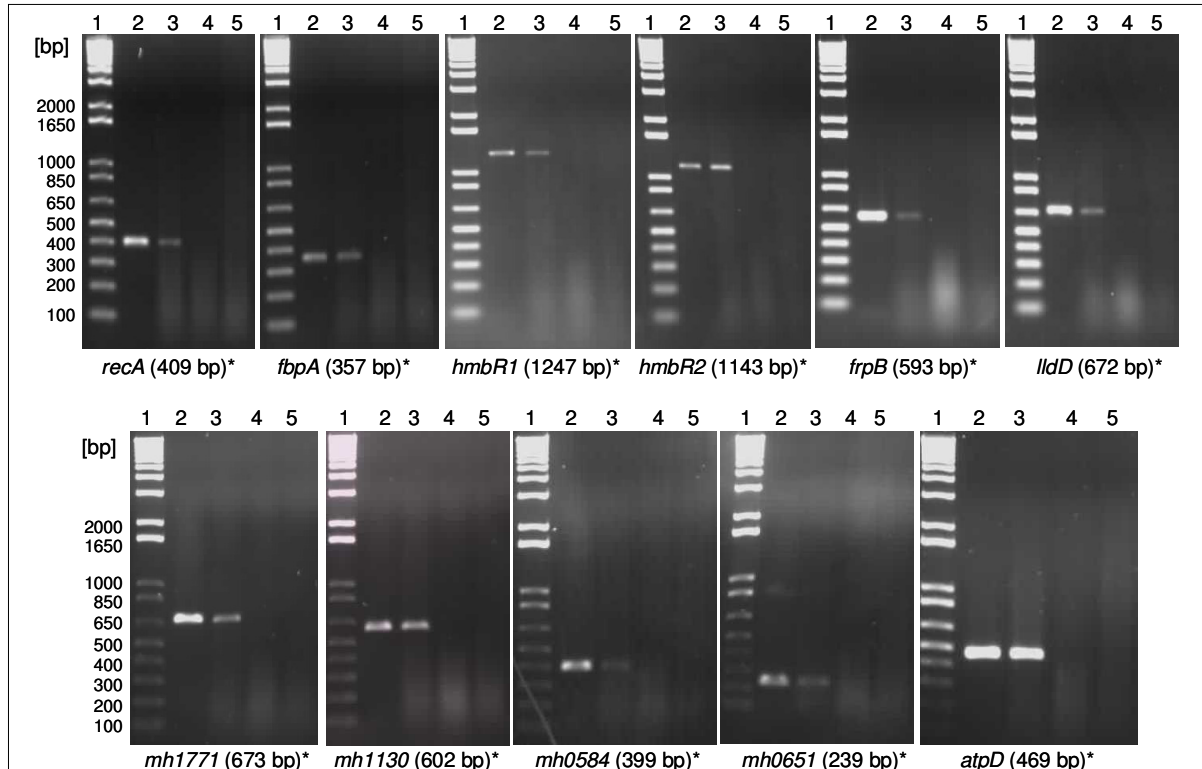


Abb. 21 RT-PCR-Analyse *in vivo* transkribierter Gene von *M. haemolytica*

Spur 1: DNA-Marker, Spur 2: PCR mit genomischer DNA von *M. haemolytica* (Positiv-Kontrolle)
Spur 3: RT-PCR mit RNA von mit *M. haemolytica* infiziertem Rinderlungengewebe, Spur 4: PCR mit RNA von mit *M. haemolytica* infiziertem Rinderlungengewebe (Kontrolle auf DNA-Kontamination)
Spur 5: RT-PCR mit RNA von nicht infiziertem Rinderlungengewebe (Negativ-Kontrolle)

*In der Klammer ist die Größe des PCR-Produkts angegeben.

3.5.2 Bestimmung der quantitativen Transkription von Genen *in vivo*

Zusätzlich zu der qualitativen Identifikation einiger Gen-Transkripte von *M. haemolytica* *in vivo* (Kapitel 3.5.1) wurde für die beiden Hämoglobin-Rezeptoren HmbR1 und HmbR2 mittels *real time* PCR auch eine relative Quantifizierung der Gen-Transkripte *in vivo* ermittelt (beispielhafte Darstellung in Abb. 22). Mit der quantitativen Analyse wurde überprüft, ob die beiden Gene, die *in vitro* bei Eisenmangel verstärkt transkribiert wurden, auch *in vivo* bei der Infektion einer Rinderlunge eine verstärkte Transkription zeigen. Die Gene der beiden Hämoglobin-Rezeptoren wurden gewählt, da ihre Transkription *in vitro* bei Wachstum unter Eisenmangel stark induziert wurde (Tabelle 8) und Hämoglobin möglicherweise eine Eisenquelle in der infizierten Rinderlunge darstellt.

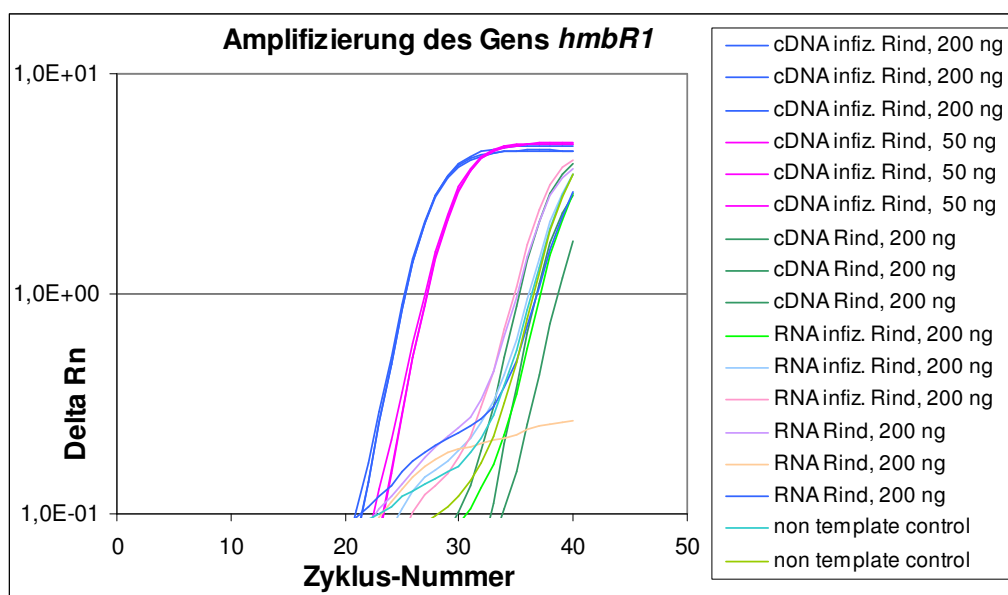


Abb. 22 Verlauf der Amplifizierung des Gens *hmbR1* von *M. haemolytica*

Für die quantitative *real time* PCR wurden die Proben aus dem infizierten Rind in zwei verschiedenen Konzentrationen mit 4fachem Unterschied (200 ng und 50 ng) eingesetzt und zeigen entsprechende Abstände von etwa 2 Zyklen. Es ist deutlich zu sehen, dass bei den cDNA-Proben aus den infizierten Rindern eine frühere Amplifikation stattfand als bei den Kontrollen. Die späte Amplifikation in den Kontrollen (cDNA aus dem Rind (nicht infiziert), gereinigte RNA aus den infizierten Rindern als auch gereinigte RNA aus dem nicht infizierten Rind als Kontrolle auf DNA-Kontamination) verläuft wie bei der NTC (*non template control*) und beruht auf der Amplifikation von Primer-Dimeren. Es wurden jeweils 3 unabhängige Messungen durchgeführt.

Delta Rn: Normalisiertes Reporter-Signal abzüglich der Basislinie

Tabelle 15 zeigt die relativen Mengen mRNA der Gene *hmbR1* und *hmbR2* von *M. haemolytica* in der infizierten Rinderlunge. Sie sind bezogen auf die Mengen mRNA dieser Gene aus in *in vitro*-Kulturen von *M. haemolytica*, angezogen unter sättigender Eisenkonzentration im Vollmedium BHI (Kontrolle). Da das Infektionsinokulum unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurde wie die Kontrolle konnte eine Veränderung der Transkription der Gene *hmbR1* und *hmbR2* vor und nach der Infektion ermittelt werden. Die relative Transkription dieser Gene in der Rinderlunge war mit Faktoren von 11 bzw. 13 gegenüber dem Infektionsinokulum deutlich erhöht. Zum Vergleich wurde die Transkriptionsänderung beider Gene nach 60 min Wachstum der Bakterien unter Eisenmangel *in vitro* ermittelt. Hier lagen die Faktoren der Transkriptionsänderung bei 25 bzw. 19.

Tabelle 15 Relative Transkription der Gene *hmbR1* und *hmbR2* *in vivo* und *in vitro*

RNA-Quelle	Relative Transkription *	
	<i>hmbR1</i>	<i>hmbR2</i>
Infiziertes Lungengewebe (<i>in vivo</i>)	11,6	13,0
Eisenmangelkultur (60 min, <i>in vitro</i>)	25,2	19,3

*Der Faktor der relativen Transkription wurde mit folgender Formel berechnet, die eine Normalisierung auf das Kontroll-Gen *recA* beinhaltet: Relative Transkription = Ziel-Gen (Zeitpunkt/Kontrolle) / Kontroll-Gen *recA* (Zeitpunkt/Kontrolle). Bei dem *in vivo*-Gewebe wurde mit der Anzahl an Molekülen gerechnet, bei den *in vitro*-Kulturen mit den Signalwerten (RFU), die in der Mikroarray-Analyse ermittelt wurden.

3.6 Untersuchungen zur Bedeutung des Gens *fur* bei *M. haemolytica*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Gene von *M. haemolytica* identifiziert werden, die einer direkten oder indirekten Regulation durch das Protein Fur, den Hauptregulator für den Eisenhaushalt (Kapitel 1.5), unterliegen. Zu diesem Zweck wurde mit verschiedenen Methoden versucht eine *M. haemolytica-fur*-Deletionsmutante (Δ -*fur*-Mutante) herzustellen. Dieses Kapitel beinhaltet zur Verdeutlichung der Vorgehensweise methodische Aspekte.

3.6.1 Identifikation des Gens *fur* und seine Regulation unter Eisenmangel

Die Genom-Sequenz von *M. haemolytica* (2.1.11.1) zeigte einen offenen Leserahmen (Lokus-ID *mh2522*, 441 bp), dessen kodiertes Protein zu 70 % identisch mit dem Protein Fur von *P. multocida* war. Weitere Vergleiche der Proteinsequenz zeigten eine Identität von 81 % zu *A. pleuropneumoniae* Fur und 61 % zu *E. coli* Fur (Abb. 23). In der durchgeführten Transkriptionsanalyse von *M. haemolytica* bei Wachstum unter Eisenmangel (Abschnitt 3.1) war die Transkription des Gens *fur* nicht verändert. Im genannten Experiment schwankten die gemessenen Signalwerte von *fur* mit einem Mittelwert von 216 RFU über den gesamten zeitlichen Verlauf nur um 14%, was einer konstitutiven Transkription entspricht, wie sie z.B. für das Kontrollgen *recA* bestimmt wurde (Kapitel 3.3). Die einzelnen Signalwerte sind in Tabelle 36 im Anhang aufgeführt.

		*	20	*	40	*	60	
Mh	:	MSEANIKRLKEVGLKVTEPRLTILALMQDIRDEMQHFAAEDIYKILLEKGSIDIGLATVYR	:	60				
Pm	:	MSEENIKLLKKAGLKITEPRLTILALMQEH--QEEHFAEDVYKMLLERGEEIGLATVYR	:	58				
App	:	MSEENAKLLKSVGLKVTEPRLTILALMQQHREMQHFAEDIYKILLEHGSIDIGLATVYR	:	60				
Ec	:	MTDNN-TALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEP--DNHHVSAEDLYKRLIDMGEEIGLATVYR	:	57				
		*	80	*	100	*	120	
Mh	:	VLNQFEEAGILTRHNF DANKAVFELNMNHEHDHII CMDCGKVFEFKDPDMERRQREI SEK	:	120				
Pm	:	VLNQFDEAKILIRHNFEGNKS VFELAPTEHHDHII CVDCGKVFEFNDDIIEKRQREITKQ	:	118				
App	:	VLNQFEEVGI LLRHNF DANKAVFELNVEQEHHDHII CMDCGKVFEFKDPDIERRQREI SEQ	:	120				
Ec	:	VLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHII CLDCGKVIEFSDDSI EARQREIAAK	:	117				
		*	140	*				
Mh	:	HGMELTNHSLYLYGKCSN--LTNCD---EKK	:	146				
Pm	:	HGIELATHSLYLYGKCSN--VKKCDEN-GKK	:	146				
App	:	HGMKLATHSLYLYAKCSD--ISHCDSSKDKK	:	149				
Ec	:	HGIRLTNHSLYLYGHCAEGDCREDEHAHEGK	:	148				

Abb. 23 Alignment des Proteins Fur

Es sind die Sequenzen des Proteins Fur von *M. haemolytica* (Mh), *P. multocida* (Pm), *A. pleuropneumonia* (App) und *E. coli* (Ec) dargestellt. Über alle Sequenzen konservierte Aminosäuren sind hellblau unterlegt, über drei Sequenzen konservierte Aminosäuren grau. Für das alignment wurde aus folgenden Genen die Aminosäure-Sequenz der Proteine ermittelt: *M. haemolytica*: Lokus-ID *mh2522*, *P. multocida*: Lokus-ID *pm0352* (May et al., 2001), *A. pleuropneumoniae*: Genbank-Nummer AAO15368.1, *E. coli*: Genbank-Nummer NP_415209.1. Das alignment wurde mit der Software GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>) erstellt.

3.6.2 Versuche zur Herstellung einer Δ -fur-Mutante in *M. haemolytica*

Zur Herstellung der Δ -fur-Mutante wurden fünf Plasmide erstellt, die mit verschiedenen Strategien zu einer Mutation führen sollten oder unterschiedliche Möglichkeiten der Selektion einer Mutante boten. Diese Plasmide wurden aus dem von der Firma Intervet zur Verfügung gestellten Plasmid pMaha-121 entwickelt. pMaha-121 ist eine Variante des Plasmids pACYC-184, bei dem das Gen für die Resistenz gegen Tetracyclin gegen das Gen für die Resistenz gegen Kanamycin ausgetauscht wurde. Das Plasmid pACYC-184 repliziert in *M. haemolytica* ineffizient mit wenigen Kopien pro Bakterium. In *E. coli* hingegen ist die Kopienzahl hoch genug, so dass Plasmid-Präparationen in größerem Maßstab möglich sind.

Zuerst wurden zwei Plasmide hergestellt (pMaha-209 und pMaha-210 (Abb. 24)), die mit dem Prinzip der doppelten homologen Rekombination zu einer Mutation im Genom führen sollten. Durch die Konstruktion der Plasmide sollte das Gen *fur* im Genom von *M. haemolytica* durch den Abschnitt der Plasmide ausgetauscht werden, der zwischen den flankierenden Regionen von *fur* liegt (Abb. 24). Auf diesem Abschnitt der Plasmide befindet sich hinter dem Promotor *Pplp4* des in *M. haemolytica* konstitutiv transkribierten

Gens *plp4* das Gen *cat*. Das Gen *cat* kodiert für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase, das gegen das Antibiotikum Chloramphenicol Resistenz-vermittelnde Enzym. Der Unterschied zwischen den beiden Plasmiden lag darin, dass in pMaha-210 der Promotor *Pplp4* mit dem nachfolgenden Gen *cat* von FRT(Flp *recombinase target*)-Stellen (Cherepanov & Wackernagel, 1995) flankiert wurde. In Plasmid pMaha-209 waren keine FRT-Stellen vorhanden. Für die Elektroporation in *M. haemolytica* wurden die beiden Plasmide aus *E. coli* präpariert. Eine Mutante wäre resistent gegen Chloramphenicol und sensitiv gegen Kanamycin. Deshalb wurden nach der Elektroporation die entstandenen Kolonien auf ihr Wachstum mit beiden Antibiotika getestet, um eine Auswahl an Kolonien für die weitere Überprüfung auf Mutanten zu treffen. Außerdem wurden sie 16-18 h in BHI-Chloramphenicol kultiviert und bei Wachstum eine Glycerin-Kultur angelegt. Der Nachweis auf eine mögliche Mutante wurde stets mit einer PCR durchgeführt. Dabei hybridisierten die beiden Primer 616 und 617 (Tabelle 27 im Anhang) im Genom von *M. haemolytica* an Stellen, die außerhalb der durch eine Mutation betroffenen Bereiche lagen. Entweder wurde eine Kultur-PCR durchgeführt, oder aus der Flüssigkultur die genomische DNA isoliert und diese in eine PCR eingesetzt.

Das Plasmid pMaha-209 wurde mittels Elektroporation 20mal in frisch hergestellte elektrokompetente *M. haemolytica* transformiert. Die Bakterien wurden nach der Elektroporation sowohl im Vollmedium BHI kultiviert als auch in BHI mit verschiedenen Konzentrationen an 2,2'-Dipyridyl (25, 50, 100 und 200 µM, jeweils 2mal). Der Eisenchelator wurde aufgrund folgender Überlegung zugegeben: Bei einer Δ -*fur*-Mutante wurde erwartet, dass aufgrund des fehlenden Repressors Fur viele Eisenaufnahmesysteme transkribiert werden. Als Folge könnten toxische Mengen an Eisen aufgenommen werden (Kapitel 1.2). Um den Transport von möglicher Weise toxischen Mengen an Eisen in das Bakterium zu unterbinden, wurde das Eisen im Medium der Agar-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen 2,2'-Dipyridyl chelatiert, die das Wachstum des Wildtyps von *M. haemolytica* nicht unterbinden. Unabhängig von der Konzentration an 2,2'-Dipyridyl in den Platten entstanden jedoch gleiche Anzahlen an Kolonien. Insgesamt waren bei allen Elektroporationen mit pMaha-209 etwa 220 Kolonien entstanden. Die Kolonien wuchsen auf beiden Antibiotika, was zwar für eine Aufnahme des Plasmids sprach, aber nicht auf eine Mutation hindeutete. Von diesen 220 Kolonien wurden etwa 30 mittels PCR überprüft (Primer 616 und 617; Tabelle 27 im Anhang), aber es konnte stets nur der *M. haemolytica*-Wildtyp nachgewiesen werden.

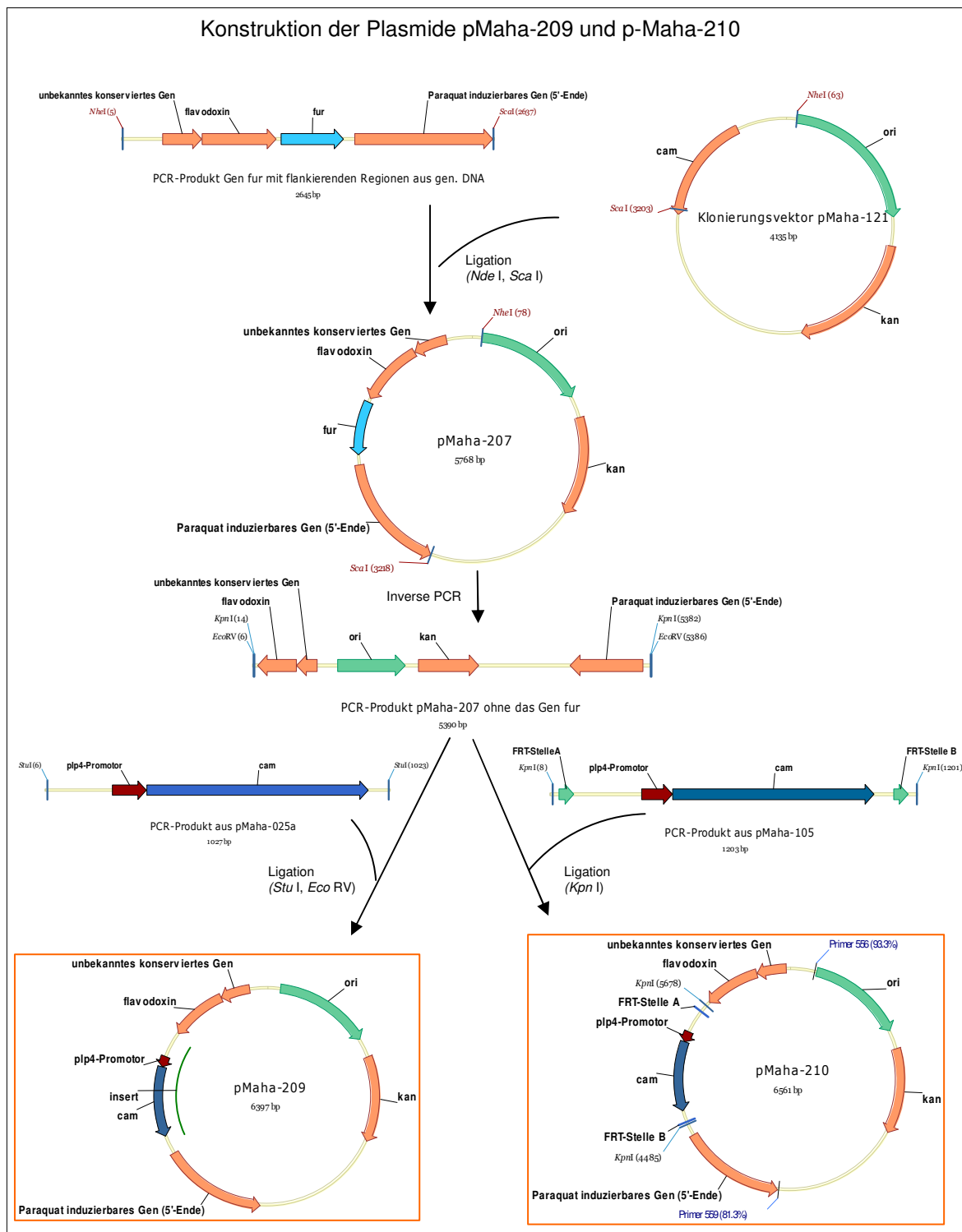


Abb. 24 Konstruktion der Plasmide pMaha-209 und pMaha-210

Es sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen gezeigt. Bei der inversen PCR wurde das Plasmid pMaha-207 bis auf einen kleinen Abschnitt komplett amplifiziert, wobei der mittlere Teil des Gens *fur* deletiert wurde. Orange umrandet sind die Plasmide pMaha-209 und pMaha-210, die zur Erzeugung einer Mutante mittels doppelter homologer Rekombination in *M. haemolytica* elektroporiert wurden.

Ergebnisse

Das Plasmid pMaha-210 wurde mittels Elektroporation insgesamt 30mal in frisch hergestellte elektrokompetente *M. haemolytica* transformiert. Die Bakterien wurden in BHI kultiviert und in BHI mit verschiedenen Konzentrationen an 2,2'-Dipyridyl (25, 50, 100 und 200 μM , jeweils 2mal). Die Überprüfung der Kolonien auf Mutanten erfolgte wie bei Verwendung des Plasmids pMaha-209 (siehe oben), doch keine der Transformanden zeigte eine Deletion von *fur*. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurde das Plasmid mit einem cytosolischen Extrakt von *M. haemolytica* methyliert (2.4.17) und anschließend in *M. haemolytica* elektroporiert. Ein weiterer Versuch bestand darin, das Plasmid zur Steigerung der Rekombinationseffizienz zu denaturieren (2.4.18), bevor es elektroporiert wurde. Ebenfalls wurde mit linearer DNA transformiert, die durch das Fehlen des Replikationsursprungs nicht in *M. haemolytica* replizieren konnte. Die lineare DNA umfasste den Abschnitt, der die FRT-Stellen, den Promotor *Pplp4* mit dem nachfolgenden Gen *cat* sowie die flankierenden Regionen des Gens *fur* aus dem Genom von *M. haemolytica* trug (Primer 556 und 559; Abb. 24 und Tabelle 22 im Anhang). Dieses PCR-Produkt wurde sowohl als linearer Doppelstrang als auch denaturiert in Form des linearen Einzelstrangs in *M. haemolytica* elektroporiert. Insgesamt entstanden bei der Verwendung des Plasmids pMaha-210 und seinen Varianten (methylierte Form, denaturierte Form, PCR-Produkt in Doppel- und Einzelstrang) etwa 360 Kolonien, von denen etwa 160 mittels PCR überprüft wurden. Es konnte jedoch stets nur der *M. haemolytica*-Wildtyp nachgewiesen werden.

Da mit der Methode der doppelten homologen Rekombination keine Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica* hergestellt werden konnte, wurde die Methode der einfachen homologen Rekombination eingesetzt. Auch in *P. multocida* wurde nach erfolglosen Bemühungen mit anderen Strategien mit der einfachen homologen Rekombination eine Δ -*fur*-Mutante hergestellt (Bosch *et al.*, 2001). Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine einfache homologe Rekombination mit höherer Wahrscheinlichkeit stattfindet als eine doppelte homologe Rekombination. Bei der einfachen homologen Rekombination entsteht eine Insertionsmutante. Hier sollte das Plasmid pMaha-235 (Abb. 25) innerhalb des Gens *fur* im Genom von *M. haemolytica* inseriert werden und dem Bakterium Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermitteln. Das Plasmid pMaha-235 wurde 3mal in frisch hergestellte elektrokompetente *M. haemolytica* elektroporiert. Dabei wurde es als doppelsträngiges Plasmid und als zirkulär einsträngiges Plasmid (2.4.18) in *M. haemolytica* elektroporiert. Es entstanden insgesamt etwa 30 Kolonien, die mittels PCR unter

Verwendung der Primer 676 und 677 (Tabelle 23 im Anhang) auf eine Mutation überprüft wurden. Dabei konnte stets nur der *M. haemolytica*-Wildtyp nachgewiesen werden.

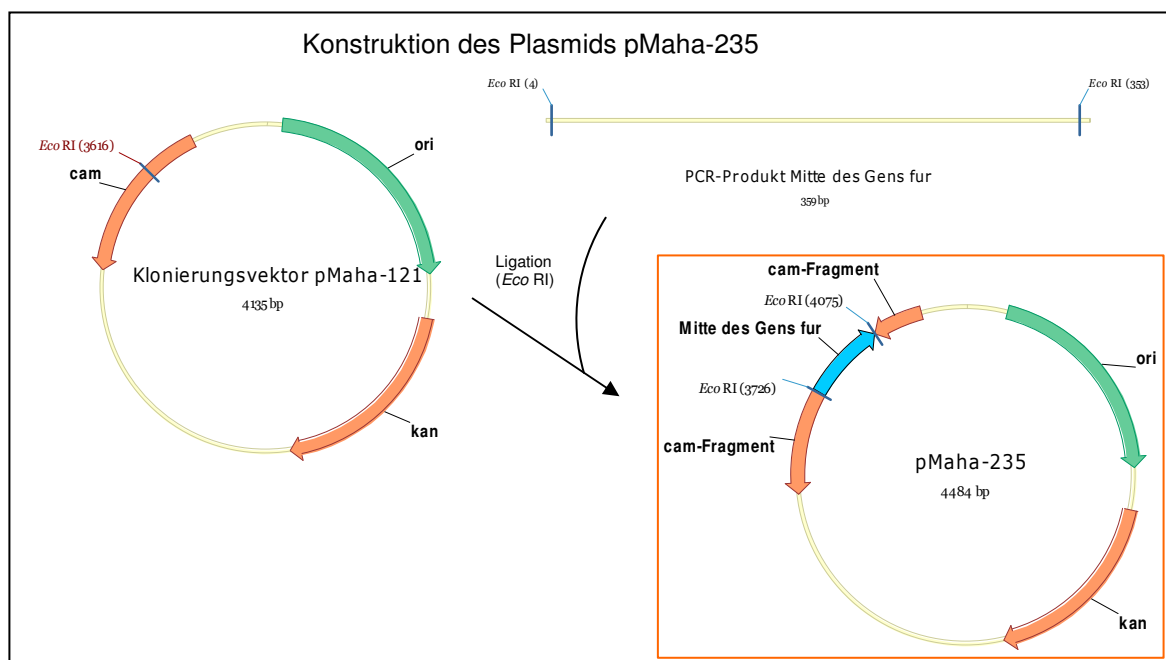


Abb. 25 Konstruktion des Plasmids pMaha-235

Es sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen gezeigt. Plasmid pMaha-235 wurde zur Erzeugung einer Mutante mittels einfacher homologer Rekombination in *M. haemolytica* elektroporiert.

Möglicherweise entstand keine Mutante, weil das stromabwärts von *fur* liegende Paraquat induzierbare Gen (*mh2523*) essentiell ist. In der Mutante würde vor dem Gen *mh2523* das Gen *cat* liegen, hinter dem ein Terminator liegt, der die Transkription des Gens *mh2523* verhindern könnte. Um einen polaren Effekt auf das benachbarte Gen *mh2523* auszuschließen, wurde ein Plasmid erstellt, das den Terminator nicht mehr enthält (pMaha-360, Abb. 26). So könnte nach der Rekombination eine Transkription des Gens *mh2523* unter der Kontrolle des Promotors *Pppl4* stattfinden. Das Plasmid pMaha-360 wurde aus *E. coli* isoliert und 4mal in frisch hergestellte elektrokompente *M. haemolytica* elektroporiert. Der Nachweis auf eine Mutation in den entstandenen Kolonien wurde mittels PCR unter Verwendung der beiden Primer 616 und 617 (Tabelle 27 im Anhang) geführt, jedoch konnte auch hier nur der Wildtyp nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Die bisherigen Versuche, eine Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica* herzustellen, waren fehlgeschlagen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die hergestellten Varianten des Plasmids pACYC nicht so ineffizient in *M. haemolytica* repliziert wurden wie angenommen. Bei einer stabilen Replikation geht das Plasmid nach der Rekombination in den *fur*-Lokus nicht verloren und die Mutanten behalten den gegen Kanamycin resistenten Phänotyp. Aufgrund dieser Überlegung wurde eine weitere Strategie für die Erzeugung einer *M. haemolytica fur*-Deletions-Mutante getestet. Dabei wurde wieder auf die doppelte homologe Rekombination zurückgegriffen, aber das gegen Chloramphenicol Resistenz vermittelnde Gen sollte unter der Kontrolle eines furregulierten Promotors stehen. Das dafür hergestellte Plasmid pMaha-236 (Abb. 26) entsprach dem Plasmid pMaha-210 mit dem Unterschied, dass der vor dem Gen *cat* liegende Promotor *Pppl4* durch den furregulierten Promotor *PtbpB* des Gens *tbpB* von *M. haemolytica* ersetzt worden war. Das Gen *tbpB* kodiert für das Lipoprotein TbpB des Transferrin-Rezeptors. Der Promotor *Pppl4* hatte bei effizienter Replikation für eine konstitutive Transkription des Gens *cat* gesorgt, während der Promotor *PtbpB* einer Regulation durch das Eisenregulator-Protein Fur unterworfen ist. Findet keine Rekombination in den *fur*-Lokus statt, bindet das Protein Fur an die Fur-Box von *PtbpB* und reprimiert die Transkription des Gens *cat*. In diesem Fall können sich die Bakterien aufgrund mangelnder Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol nicht vermehren und keine Kolonien bilden. Erst nach erfolgter Integration des Gens *cat* und Zerstörung des Gens *fur* würde die Repression aufgehoben und eine resistente Mutante entstehen. Der *Fur*-regulierte Promotor *PtbpB* in Plasmid pMaha-236 ermöglicht so eine positive Selektion auf die Deletion des Gens *fur*. Das aus *E. coli* isolierte Plasmid pMaha-236 wurde 5mal in frisch hergestellte elektrokompente *M. haemolytica* elektroporiert. Einmal wurden die Bakterien mit 200 μ M 2, 2'-Dipyridyl kultiviert, um bei einer Mutation einer übermäßigen Eisenaufnahme mit möglicherweise toxischen Auswirkungen vorzubeugen (wie auch bei den Plasmiden pMaha-209 und pMaha-210), die anderen Male nur mit BHI. Bei keiner dieser Elektroporationen ist eine Kolonie entstanden, was einen Hinweis darauf gibt, dass das Gen *fur* in *M. haemolytica* möglicherweise eine essentielle Funktion hat.

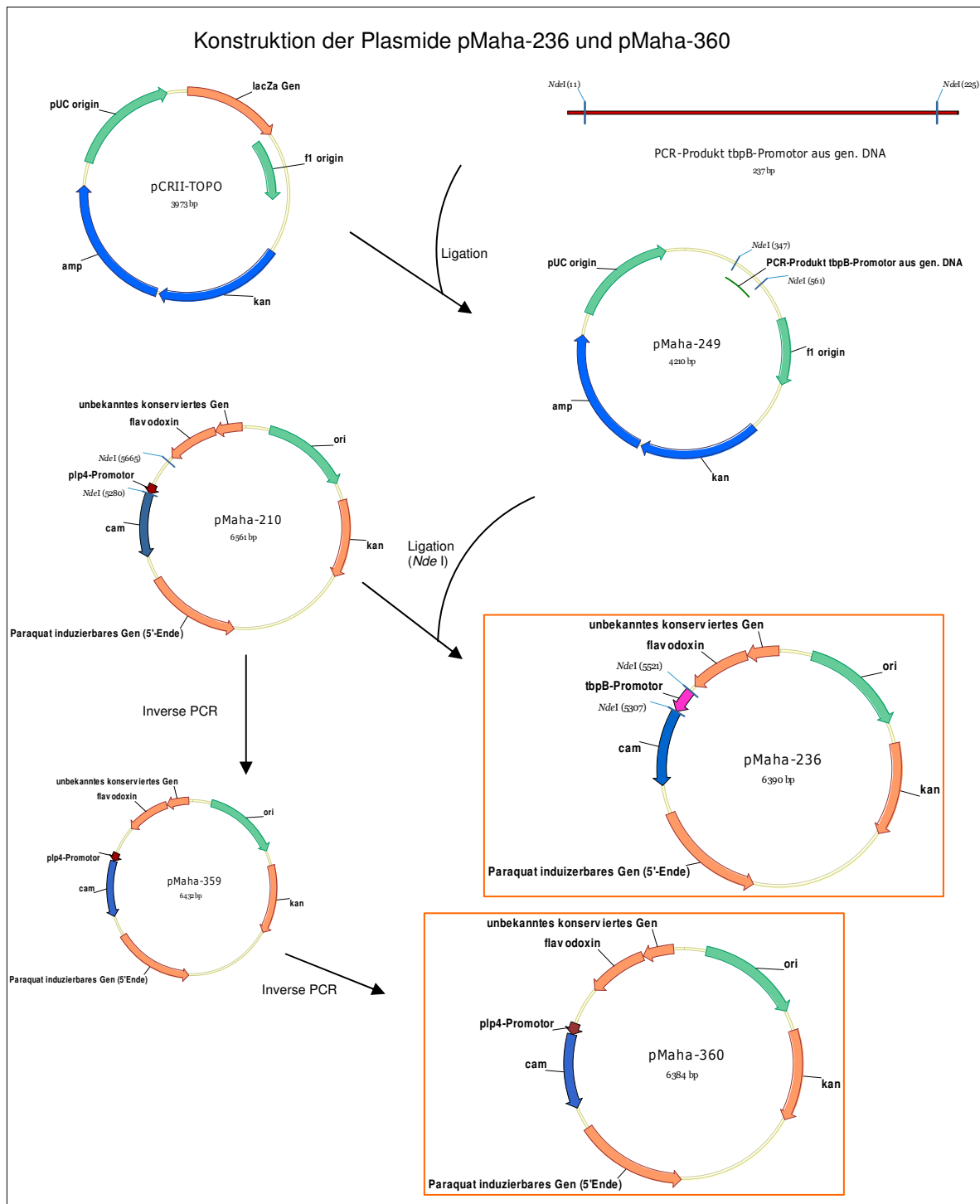


Abb. 26 Konstruktion der Plasmide pMaha-236 und pMaha-360

Es sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen gezeigt. Das Insert in pMaha-249 und die Promotor-Sequenz in pMaha-236 wurden zur Kontrolle sequenziert und entsprachen den erwarteten Sequenzen. Bei der inversen PCR wurde das *template*-Plasmid bis auf einen kleinen Abschnitt komplett amplifiziert, wobei jeweils eine Terminator-Sequenz eliminiert wurde. Orange umrandet sind die Plasmide pMaha-236 und pMaha-360, die zur Erzeugung einer Mutante mittels doppelter homologer Rekombination in *M. haemolytica* elektroporiert wurden.

3.6.3 Hinweis auf die essentielle Funktion des Gens *fur* in *M. haemolytica*

Die in dieser Arbeit hergestellten und in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Plasmide boten verschiedene Möglichkeiten zur Erzeugung und Selektion einer Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica*. Es konnte jedoch keine Δ -*fur*-Mutante erstellt werden. Möglicherweise ist das Gen *fur* in *M. haemolytica* essentiell. Um die essentielle Funktion des Gens *fur* zu testen, wurde *fur* in *antisense*-Richtung zu einem Promotor auf einem Plasmid in *M. haemolytica* elektroporiert. Dabei sollte das Gen *fur* in umgekehrter Richtung zum Original im Genom transkribiert werden und die beiden Einzelstränge – der vom Plasmid und der vom Genom – würden einen mRNA-Doppelstrang bilden. Doppelstränge werden nicht von den Ribosomen gebunden, so dass es nicht zur Translation kommt. Die ausbleibende Translation des Proteins hätte zur Folge, dass das Protein Fur in einer geringeren, möglicherweise wachstumsverzögernden Konzentration im Cytosol vorläge. Für die Konstruktion der erforderlichen Plasmide wurde das von der Firma Intervet zur Verfügung gestellte Plasmid pMaha-016a verwendet. Es ist eine Variante des Plasmids pYFC (Chang *et al.*, 1992), das in *M. haemolytica* repliziert. Daraus wurden ein *fur*-sense- und ein *fur*-antisense-Plasmid hergestellt (Abb. 27), bei denen das Gen *fur* hinter dem Promotor *Pplp4* liegt. Dazu wurde von Plasmid pMaha-207 das Gen *fur* mit zwei verschiedenen Primer-Paaren (Tabelle 28 im Anhang) amplifiziert, so dass es einmal in *sense*- und einmal in *antisense*-Richtung hinter einem Start-Codon lag. Die beiden PCR-Produkte wurden jeweils in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert und nach Aufreinigung daraus in Plasmid pMaha-016a, in dem sie das Gen *cat* stromabwärts des Promotors *Pplp4* ersetzten. Nach Präparation der Plasmide aus *E. coli* wurden sie jeweils in frisch hergestellte elektrokompente *M. haemolytica* (Wildtyp) elektroporiert. Dabei entstanden die Stämme M7/2 # 357 (Träger des Plasmids pMaha-357 mit dem Gen *fur* in *sense*-Richtung) und M7/2 # 358 (Träger des Plasmids pMaha-358 mit dem Gen *fur* in *antisense*-Richtung). Der Stamm M7/2 # 357 wurde benötigt, um den oben beschriebenen „*antisense*-Effekt“ zu erzielen. Der Stamm M7/2 # 358 war für spätere Mikroarray-Analysen hergestellt worden, um zu prüfen, ob die verstärkte Transkription des Gens *fur* eine Auswirkung auf das Transkriptom bei Wachstum im Vollmedium hat.

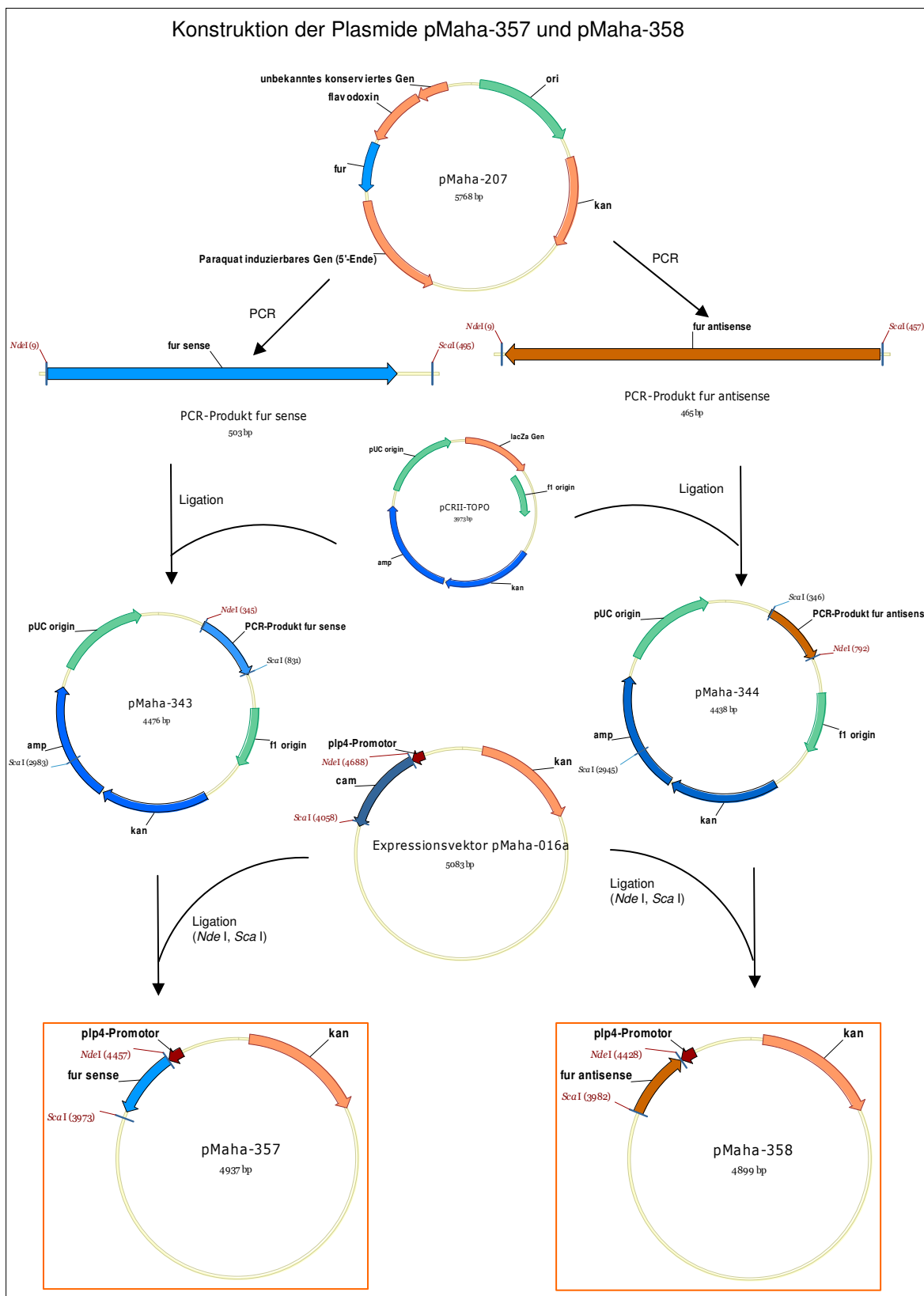


Abb. 27 Konstruktion der Plasmide pMaha-357 und pMaha-358

Es sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen gezeigt. Orange umrandet sind die beiden Plasmide, die in *M. haemolytica* elektroporiert wurden.

Es wurden Wachstumskurven von den beiden hergestellten Stämmen M7/2 # 357 und M7/2 # 358 erstellt. Die Aufnahme von Wachstumskurven des Stammes M7/2 # 358 diente zur Überprüfung, ob die verstärkte Transkription des Gens *fur* Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Bakterien hat. Als Kontrolle diente der Stamm *M. haemolytica* M7/2 # 118, dessen Plasmid (pMaha-118) dem Plasmid pMaha-016a mit dem Unterschied entspricht, dass es nicht die Sequenzen für den Promotor *Pplp4* und das nachfolgende Gen *cat* besitzt. Vom *M. haemolytica*-Wildtyp wurden ebenfalls Wachstumskurven erstellt, um den nicht signifikanten Unterschied zur Kontrolle M7/2 # 118 zu zeigen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte wie für die Mikroarray-Studie (2.3.2.4). Abb. 28 zeigt exemplarisch die Wachstumskurven von *M. haemolytica* Wildtyp und den drei Stämmen M7/2 # 118, M7/2 # 357 und M7/2 # 358. In der hier gewählten halblogarithmischen Darstellung ist die exponentielle Wachstumsphase der Bakterien als Gerade zu sehen, aus deren Steigung die Wachstumsrate berechnet wurde, die zur Berechnung der Verdopplungszeit benötigt wurde (2.3.3). Es ist zu sehen, dass die Steigung der Geraden bei den Bakterien mit dem *fur*-antisense-Plasmid (M7/2 # 358) weniger steil verläuft als bei den anderen drei Stämmen, was einer längeren Verdopplungszeit entspricht. In Tabelle 16 sind die Mittelwerte der Verdopplungszeiten aus den Wachstumsverläufen mit den Standard-Abweichungen aufgelistet.

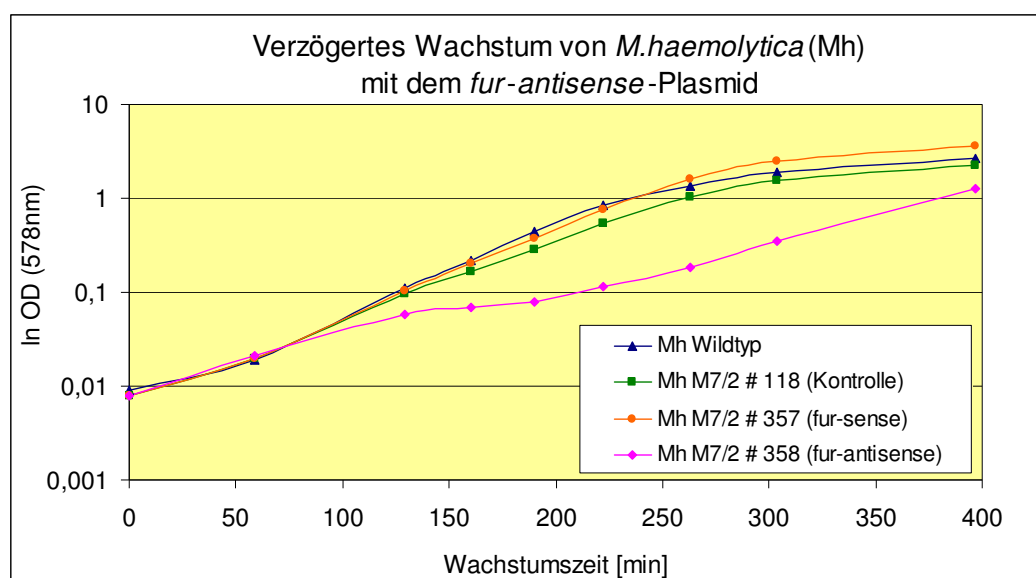


Abb. 28 Verzögertes Wachstum von *M. haemolytica* (Mh) mit dem *fur*-antisense-Plasmid

Halblogarithmische Darstellung eines repräsentativen Wachstumsverlaufs von *M. haemolytica* mit den Plasmiden pMaha-118, pMaha-357 und pMaha-358 im Vergleich zum Wildtyp. Es ist zu sehen, dass *M. haemolytica* mit dem Gen *fur* in *antisense*-Richtung auf dem Plasmid langsamer wuchs als der Wildtyp und *M. haemolytica* mit den anderen beiden Plasmiden. Zur Anzahl der insgesamt durchgeführten Wachstumsverläufe siehe Tabelle 16.

Die Berechnungen aus den Wachstumskurven ergaben für den *M. haemolytica*-Wildtyp, den Stamm M7/2 # 118 (mit dem Kontroll-Plasmid) und den Stamm M7/2 # 357 (mit dem *fur-sense*-Plasmid) Verdopplungszeiten von 31 – 35 min (Tabelle 16). Der Unterschied in den Verdopplungszeiten zwischen dem Wildtyp und den beiden Stämmen war nicht signifikant (p-Wert > 0,05). Die aus den Wachstumskurven des Stammes M7/2 # 357 (mit dem *fur antisense*-Plasmid) berechneten Verdopplungszeiten betragen durchschnittlich 59 min und zeigten im Vergleich zum Stamm M7/2 # 118 (mit dem Kontroll-Plasmid) einen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,002). Das verzögerte Wachstum von *M. haemolytica* M7/2 # 357 mit dem *fur-antisense*-Plasmid deutet darauf hin, dass das Gen *fur* in *M. haemolytica* essentiell ist.

Tabelle 16 Verdopplungszeiten der *M. haemolytica*-Stämme

<i>M. haemolytica</i> -Stamm	Verdopplungszeiten ¹ [min]	t-Test in Bezug auf M7/2 # 118 [p-Wert]
M7/2 (Wildtyp)	31,9 ± 2,9 (n = 5)	0,201
M7/2 # 118 (mit Plasmid-Kontrolle)	35,0 ± 3,2 (n = 3)	-
M7/2 # 357 (mit <i>fur-sense</i> -Plasmid)	33,1 ± 2,8 (n = 4)	0,434
M7/2 # 358 (mit <i>fur-antisense</i> -Plasmid)	59,0 ± 5,9 (n = 4)	0,002

¹angegeben sind der Mittelwert ± Standard-Abweichung

4 Diskussion

4.1 Der Einsatz von Mikroarrays zur Untersuchung bakterieller Transkriptome

Die Mikroarray-Analyse zur Bestimmung bakterieller Transkriptionsprofile bei definierten Kultur-Bedingungen findet seit Ende der 1990er Jahre weltweiten Einsatz. Der große Vorteil der Mikroarray-Technologie liegt darin, dass das gesamte Transkriptom eines oder mehrerer Bakterien gleichzeitig untersucht werden kann. Bei herkömmlichen Methoden wie z.B. der RT-PCR ist dies nicht möglich. Doch es gibt einige Aspekte, die bei der Interpretation von Mikroarray-Analysen kritisch bedacht werden sollten. Die Analyse spiegelt das Transkriptom nur zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen wider. Sehr kurzlebige oder instabile Gen-Transkripte bleiben dabei ebenso unberücksichtigt wie posttranskriptionelle Regulationen mit Einfluss auf die Proteinexpression. Trotz dieser Einschränkungen kann die Mikroarray-Technologie Hinweise auf transkribierte Gene *in vitro* und *in vivo* liefern. Der Nachweis für die Bedeutung eines Proteins *in vitro* oder *in vivo* muss jedoch mit anderen Methoden erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Herstellung von Mutanten, bei denen das Gen für das Protein von Interesse ausgeschaltet ist und die nachfolgende Infektion im Tierexperiment. Auch der Nachweis von Antikörpern im Wirt gegen ein bestimmtes bakterielles Protein liefert eine Aussage darüber, ob ein Protein bei der Infektion *in vivo* exprimiert wird oder nicht.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroarray war ein Multigenom-Mikroarray der Firma Affymetrix. Auf ihm ist die genetische Information zweier Bakterien, *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella multocida*, dargestellt. Die Gen-Abschnitte von *M. haemolytica* auf dem Multigenom-Mikroarray beruhen auf der Sequenz des untersuchten Rinder-Isolats M7/2 (Kapitel 2.1.11.1). Bei der Qualitätsprüfung der Oligonukleotide (Kapitel 2.2) konnten wir zeigen, dass 99,4 % der Oligonukleotide von *M. haemolytica* des Mikroarrays mit der genomischen DNA von *M. haemolytica* hybridisierten, was einer sehr hohen Qualität der Oligonukleotide entspricht. Die Gen-Abschnitte von *P. multocida* auf dem Mikroarray beruhen auf der Genom-Sequenz des Vogel-Isolats Pm70 (May *et al.*, 2001). Diese Sequenz wurde verwendet, da sie die einzige vorhandene Genom-Sequenz eines *P. multocida*-Stammes war. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch das Transkriptom eines Rinder-Isolats von *P. multocida* (L386) mit diesem Mikroarray untersucht (Kapitel 4.3). Bei der Qualitätsprüfung der Oligonukleotide zeigte sich, dass 95,5 % der Oligonukleotide von *P. multocida* Pm70 des Mikroarrays mit der

genomischen DNA von *P. multocida* L386 hybridisieren (Kapitel 2.2). Dass es möglich ist, Isolate einer Spezies mit einem Mikroarray zu untersuchen, dessen Gen-Abschnitte auf dem Genom eines anderen Isolats dieser Spezies beruhen, zeigte die Arbeit von Boyce *et al.* (2002). Die Gruppe konnte mit einem Mikroarray, der auf der Sequenz von Pm70 beruhte, sowohl Gene mit verstärkter als auch mit verminderter Transkription des Stammes X-73 von *P. multocida* nachweisen, der aus dem Blut infizierter Hühner isoliert worden war. Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Multigenom-Mikroarray konnte in der Firma Intervet Innovation GmbH gezeigt werden, dass bei nur 1,26 % der Gen-Abschnitte auf dem Mikroarray Kreuzhybridisierungen zwischen *M. haemolytica* und *P. multocida* vorkamen, was für eine sehr hohe Speziesspezifität der Oligonukleotide auf dem Mikroarray spricht. Die Kreuzhybridisierungen traten in erster Linie bei den stark konservierten Genen der ribosomalen Proteine auf. Die *probe sets* dieser Gene wurden bei der Auswertung vernachlässigt. Die durchgeführten Untersuchungen zur Spezifität der Oligonukleotide zeigten die Eignung des Multigenom-Mikroarrays für die simultane Hybridisierung der in cDNA revers transkribierten RNA beider Pathogene. Die gleichzeitige Hybridisierung der cDNA zweier Bakterien auf einen Mikroarray sparte Zeit, da die Schritte der cDNA-Synthese und der Hybridisierung nur einmal durchgeführt werden mussten, und sie stellte eine Kostenersparnis dar, da ein Mikroarray anstelle von zweien verwendet werden konnte.

4.2 Die transkriptionelle Reaktion von *M. haemolytica* auf Eisenmangel *in vitro*

4.2.1 Genereller Überblick über die Eisenregulation

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals das Transkriptom des bakteriellen Rinder-Pathogens *M. haemolytica* bei Wachstum unter Eisenmangel beschrieben. Mittels Mikroarray-Technologie wurden 129 Gene mit veränderter Transkription bei Eisenmangel identifiziert. 63 Gene zeigten eine verstärkte Transkription, 66 Gene zeigten eine verminderte Transkription. Die Darstellung der Gene mit veränderter Transkription in Venn-Diagrammen (Abb. 11) verdeutlicht, dass jeweils zwei Drittel der Gene über den gesamten untersuchten Zeitverlauf konstant erhöht (37 von 63) oder konstant vermindert (44 von 66) transkribiert wurden. Etwa ein Drittel der Gene wurde jeweils nur zu einem Zeitpunkt verändert transkribiert. Als Gene mit veränderter Transkription wurden diejenigen definiert, die bei mindestens einem Zeitpunkt einen 2fachen Unterschied im Transkriptionsniveau zur Kontrolle zeigten. Der Grenzwert des 2fachen Unterschieds

wurde in ähnlichen Studien ebenfalls verwendet (May *et al.*, 2001; Paustian *et al.*, 2001; Merrell *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2005). Die Darstellung der regulierten Gene in Venn-Diagrammen (Abb. 11) zeigt für 6 Gene nur zu dem frühen Zeitpunkt von 15 min eine veränderte Transkription. Fünf dieser Gene zeigten jedoch über den gesamten untersuchten Zeitraum einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, der allerdings knapp unterhalb des Faktors 2 lag (Tabelle 8). Zu diesen Genen gehören z. B. die Gene *fbpB*, *fbpC* und *tonB*, deren kodierte Proteine an der Eisenaufnahme beteiligt sind.

Die Gene, die zum mittleren oder späten Zeitpunkt verändert transkribiert wurden, könnten eine Sekundär-Antwort darstellen. Eine Sekundär-Antwort würde erklären, weshalb viele von diesen Genen für Proteine kodieren, die nicht offensichtlich an der Eisenaufnahme beteiligt sind, wie z.B. Enzyme, die in den Zucker-Stoffwechsel involviert sind (Tabelle 8).

Die meisten der konstant verstärkt transkribierten Gene kodieren für Proteine, die an Aufnahme-Prozessen von Eisen beteiligt sind (29 von 37 Genen). Damit verstärkt das Bakterium seine Möglichkeiten die sinkende Eisenkonzentration im Cytosol auszugleichen. Die Hälfte der Gene mit konstant verminderter Transkription (22 von 44 Genen) kodiert für eisenhaltige Proteine. Die verminderte Expression von Enzymen mit Eisen-Schwefel-Clustern oder eisenhaltigen prosthetischen Gruppen könnte eine Strategie darstellen, das noch vorhandene Eisen für essentielle Stoffwechsel-Prozesse aufzusparen, indem die Produktion von nicht essentiellen, eisenhaltigen Enzymen vermindert wird. Dieses Muster der transkriptionellen Reaktion auf Eisenmangel wurde auch bei Mikroarray-Analysen anderer Bakterien wie *P. multocida* (Paustian *et al.*, 2001), *E. coli* (McHugh *et al.*, 2003), *H. pylori* (Merrell *et al.*, 2003), *C. jejuni* (Holmes *et al.*, 2005) oder *Y. pestis* (Zhou *et al.*, 2006) gefunden. Die Darstellung der funktionellen Klassifizierung der Gene von *M. haemolytica* mit veränderter Transkription in einem Balkendiagramm (Abb. 12) verdeutlicht dieses Prinzip. Die größte Gruppe der induzierten Gene kodiert für Transport- und Bindungsproteine. Von diesen 37 Genen kodieren 28 für Eisen-Transportproteine und Permeasen von Kationen (Tabelle 8). In dieser Gruppe waren auch 10 der 11 Gene mit der größten transkriptionellen Verstärkung enthalten (> 16fach). Die größte Gruppe der Gene mit verminderter Transkription kodiert für Proteine des Energie-Stoffwechsels. Unter diesen 28 Genen waren die Gene enthalten, die für den Nitrat-Reduktase-Komplex (*napABCDFGH*), den Nitrit-Reduktase-Komplex (*nrfABCD*) und den Fumarat-Reduktase-Komplex (*frdABCD*) kodieren. Diese eisenhaltigen Proteine sind an der anaeroben Atmung beteiligt und unter den Versuchsbedingungen *in vitro* vermutlich

nicht essentiell. Die ermittelten Daten deuten darauf hin, dass *M. haemolytica*, wie andere Bakterien, einem Eisenmangel damit begegnet, die Transkription der Eisenaufnahmesysteme zu verstärken und die Transkription von Genen, die für eisenhaltige Proteine kodieren, zu verringern (Andrews *et al.*, 2003).

4.2.2 Regulation der Gene für Eisenaufnahmesysteme

M. haemolytica induzierte bei Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* die Transkription mehrerer Gene, die für die Aufnahme von Eisen aus verschiedenen Eisenquellen kodieren (Tabelle 8). Sie sind schematisch in Abb. 29 mit der vermutlichen Lokalisierung in den beiden bakteriellen Membranen dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Systeme beschrieben und ihre Bedeutung im Infektionsgeschehen diskutiert.

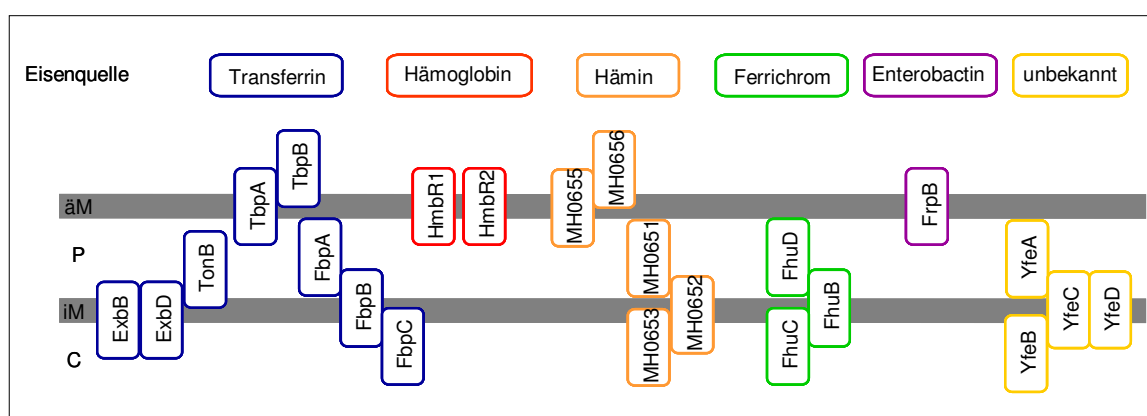


Abb. 29 Verstärkt transkribierte Eisenaufnahmesysteme von *M. haemolytica* bei Eisenmangel *in vitro*

äM: äußere Membran, P: Periplasma, iM: innere Membran, C: Cytoplasma

Regulation der Gene für die Aufnahme von Eisen aus Transferrin

Bovines Transferrin stellt für *M. haemolytica* eine Eisenquelle dar. Dies wurde von Ogunnariwo und Schryvers (1990) dadurch nachgewiesen, dass bovines Transferrin als einzige Eisenquelle für mehrere Isolate von *M. haemolytica* A1 dienen konnte. Das in dieser Arbeit verwendete Isolat von *Mannheimia* A1 konnte ebenfalls auf bovinem Transferrin als einziger Eisenquelle wachsen, während es humanes Transferrin nicht nutzen konnte (unveröffentlichte Daten von Volker Spehr, Intervet Innovation GmbH). Auch in der Rinderlunge stellt Transferrin eine mögliche Eisenquelle dar, denn 3 % des gesamten Transferrins im Säugetier kann in der Broncho-Alveolar-Flüssigkeit nachgewiesen werden (Ewers *et al.*, 2004). Einen Hinweis für die bedeutende Funktion des Transferrin-Rezeptor-Komplexes von *M. haemolytica* während des Infektionsprozesses

Diskussion

im Rind wurde durch einen Impfstoff gezeigt, der auf dem TbpAB-Rezeptor von *M. haemolytica* beruhte. Dieser Impfstoff konnte Rinder vor einer experimentellen *M. haemolytica*-Infektion schützen (Potter *et al.*, 1999).

M. haemolytica transkribierte bei Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* verstärkt die Gene, deren kodierte Proteine den gesamten Transportweg für die Aufnahme von Eisen aus Transferrin von der äußeren Membran durch das Periplasma ins Cytosol bilden. Das sind im einzelnen der Transferrin-Rezeptor TbpA mit seinem assoziierten Lipoprotein TbpB, an den Transferrin aus der Umgebung des Bakteriums gebunden wird (Ogunnariwo *et al.*, 1997), der Proteinkomplex TonB-ExbBD, der die Energie des Protonen-Gradienten über der inneren Membran auf TbpA überträgt (Graham & Lo, 1997), und das ABC-Transport-System FbpABC (Kirby *et al.*, 1998). FbpA ist ein periplasmatisches Protein, das Eisen auf den Membran-Komplex FbpBC in der inneren Membran überträgt. In diesem Komplex ist FbpC die Energie liefernde ATPase im Cytosol, die dazu beiträgt, dass die Permease FbpB das Eisen über die innere Membran ins Cytosol transportieren kann.

Die Energie für den Transport von Eisen aus Transferrin durch die äußere Membran vermittelt das Proteinsystem TonB-ExbBD. Dieses System ist bei vielen gramnegativen Bakterien der Energieüberträger für mehrere Eisenaufnahmesysteme (Braun, 2006). Das Protein TonB von *M. haemolytica* ist mit TonB2 von *Actinobacillus pleuropneumoniae* zu 55 % identisch. TonB2 von *A. pleuropneumoniae* spielt im Kontext der Infektionen von Schweinen durch *A. pleuropneumoniae* eine wichtige Rolle (Tonpitak *et al.*, 2000; Beddek *et al.*, 2004). Bei *P. multocida* wurde gezeigt, dass das Gen *tonB* essentiell für die Ausprägung der Virulenz ist (Bosch *et al.*, 2002a). Auch für *M. haemolytica* könnte dieses System eine wichtige Funktion im Rahmen einer Infektion der Rinderlunge besitzen, doch dies wurde noch nicht gezeigt. Zum Protein TonB von *E. coli* zeigt das Protein von *M. haemolytica* mit 26 % jedoch eine geringe Identität.

Die Gene *tbpAB*, *tonB*, *exbBD* und *fbpABC* wurden mit Faktoren von 2 bis 7 nur moderat verstärkt transkribiert. Die mäßige Erhöhung der Transkription könnte die Notwendigkeit widerspiegeln, die Menge an aufgenommenem Eisen in das Cytosol zu kontrollieren. Da die Gene für die Aufnahme von Eisen bei Eisenmangel verstärkt transkribiert werden, könnte zu viel Eisen ins Cytosol gelangen. Ein Überschuss an Eisen würde wiederum zu Protein schädigenden Hydroxyl-Radikalen führen, die in Anwesenheit von freiem Eisen durch die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion (Braun, 1997) gebildet werden. Die Stärke der Transkription des Gens *tbpB* von *M. haemolytica* *in vivo* könnte auch in Abhängigkeit vom Infektionsstadium erfolgen, denn Lo *et al.* (2006)

konnten keine Transkripte von *tbpB* mittels *real time* PCR in Extrakten aus Lungen-Waschungen infizierter Kälber nachweisen. Das Vorhandensein von Transkripten des Gens *tbpA* wurde in der Studie von Lo *et al.* (2006) jedoch nicht untersucht. Es wurde vermutet, dass Transferrin eher in den frühen Phasen der Infektion als Eisenquelle dienen könnte als in den späten Phasen. In den späten Phasen lägen bereits viele lysierte Wirtszellen in der Lunge vor, die andere Eisenquellen in größerer Menge liefern könnten, wie z.B. Hämoglobin.

Regulation der Gene für die Aufnahme von Eisen aus Hämoglobin und Hämin

Auch Hämoglobin stellt *in vitro* eine Eisenquelle für *M. haemolytica* dar, was für verschiedene Stämme gezeigt wurde (Ogunnariwo & Schryvers, 1990). Das in dieser Arbeit verwendete Isolat kann bovines Hämoglobin ebenfalls als einzige Eisenquelle nutzen (unveröffentlichte Daten von Volker Spehr, Intervet Innovation GmbH).

Die Gene der potentiellen Rezeptoren und Transporter für die Aufnahme von Eisen aus Hämoglobin und Hämin zeigten in der Eisenmangelstudie der vorliegenden Arbeit eine 11-180fache Verstärkung in der Transkription. Dazu gehörten die Gene, die für die beiden Hämoglobin-Rezeptoren HmbR1 und HmbR2 von *M. haemolytica* kodieren (Abb. 29). Sie haben auf Proteinebene eine Identität von 32 % (HmbR1) bzw. 44 % (HmbR2) zum Hämoglobin-Rezeptor von *Neisseria meningitidis* (NMB1668). Die beiden verstärkt transkribierten Gene *mh0655* und *mh0656* kodieren wahrscheinlich für einen Rezeptor-Komplex der äußeren Membran, der an der Aufnahme von Hämin beteiligt ist. Die kodierten Proteine zeigen Ähnlichkeit zu einem Hämin-Rezeptor-System in *C. jejuni* (Holmes *et al.*, 2005). Dieses besteht aus einem die äußere Membran durchspannenden Protein (Cj0178 mit 36 % Proteinidentität zu MH0655) und einem assoziierten Lipoprotein (Cj0177 mit 34 % Proteinidentität zu MH0656). Nach Bindung an den Hämin-Rezeptor wird Hämin als gesamtes Molekül durch das Periplasma und die innere Membran transportiert (Clarke *et al.*, 2001). Bei *M. haemolytica* kodieren vermutlich die Gene *mh0651-mh0653* für die Proteine dieses Transportprozesses. Sie befinden sich im Genom in unmittelbarer Nähe und entgegengesetzter Richtung von den Genen für den möglichen Hämin-Rezeptor-Komplex (MH0655 und MH0656). *Mh0651* kodiert für ein Protein mit 32 % Identität zu dem periplasmatischen Hämin-Bindungsprotein PhuT von *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2000). Die beiden Gene *mh0652* und *mh0653* kodieren wahrscheinlich für einen möglichen ABC-Transporter-Komplex durch die innere Membran. Ihre Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu anderen Hämin ABC-Transport-

Komplexen wie zu dem ABC-Transporter PA4707 von *P. aeruginosa* mit 53 % Identität (MH0652) und 38 % Identität zu HemV von *Y. enterocolitica* (MH0653).

Die stark erhöhte Transkription dieser Systeme bei Eisenmangel könnte auf eine Verwendung von Häm und Hämoglobin als Eisenquelle für *M. haemolytica* in der Rinderlunge hinweisen. Die *in vivo*-Untersuchungen der Gen-Transkripte von *hmbR1* und *hmbR2*, die in der vorliegenden Arbeit mit der Methode der *real time* PCR durchgeführt wurden, verstärken diesen Hinweis (siehe Abschnitt 4.5).

Regulation der Gene für die Aufnahme von Siderophoren

Es gibt Bakterien, die Xenosiderophore - Siderophore, die von anderen Organismen produziert wurden - als Eisenquelle nutzen können. Bei *N. gonorrhoeae* z.B. konnte keine Produktion von Siderophoren nachgewiesen werden, aber das Bakterium kann mit Enterobaktin, einem von *E. coli* produzierten Siderophor, als Eisenquelle wachsen und ein Rezeptor für Enterobaktin (FrpB) wurde nachgewiesen (Carson *et al.*, 1999). Bei *A. pleuropneumoniae* wurde ebenfalls keine Sekretion von Siderophoren nachgewiesen (Niven *et al.*, 1989), aber das Wachstum mit dem Siderophor Ferrichrom als Eisenquelle konnte gezeigt werden (Diarra *et al.*, 1996a).

Für *M. haemolytica* ist die Produktion von Siderophoren nicht nachgewiesen worden, wohl aber das Wachstum mit Xenosiderophoren (Reissbrodt *et al.*, 1994; Diarra *et al.*, 1996b). Bei Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* hat *M. haemolytica* Gene verstärkt transkribiert, deren kodierte Proteine Sequenzähnlichkeiten mit den Siderophor-Transportern anderer Bakterien haben (Abb. 29). Dazu gehört ein ABC-Transport-System für den Transport von Ferrichrom durch das Periplasma und die innere Membran. Es wird von den Proteinen FhuBCD gebildet, die 39 %, 50 % bzw. 25 % Identität zu dem Ferrichrom-Transport-System FhuBCD von *A. pleuropneumoniae* besitzen (Mikael *et al.*, 2002). Das Gen für einen potentiellen Ferrichrom-Rezeptor FhuA der äußeren Membran konnte auch identifiziert werden (25 % Identität zur Proteinsequenz von FhuA aus *A. pleuropneumoniae*). In dieser Arbeit wurde *fhuA* jedoch weder bei Wachstum in Vollmedium noch unter Eisenmangel transkribiert. Baltés *et al.* (2003) wiesen nach, dass FhuA von *A. pleuropneumoniae* nicht essentiell für seine Virulenz ist. So kann vermutet werden, dass das System FhuABCD für die Aufnahme von Ferrichrom für *M. haemolytica* bei der Infektion der Rinderlunge keine wichtige Funktion hat. Bei *M. haemolytica* liegen die Gene für den Rezeptor von Ferrichrom und das ABC-Transport-System nicht wie bei *A. pleuropneumoniae* in einem Operon (Mikael *et al.*, 2002). Trotz dieser Unterschiede in der genetischen Lokalisierung

wurde auch bei *A. pleuropneumonia* der Rezeptor FhuA unter Eisenmangel nicht verstärkt transkribiert (Mikael *et al.*, 2003). Die geringe Bedeutung des Systems FhuABCD für *M. haemolytica* wird dadurch unterstützt, dass die von Reissbrodt *et al.* (1994) untersuchten Stämme von *M. haemolytica* nicht auf Ferrichrom als Eisenquelle wachsen konnten. Für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm M7/2 von *M. haemolytica* stehen entsprechende Untersuchungen noch aus. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Gene von *M. haemolytica* für ein anderes System zur Aufnahme von Eisen kodieren.

Das Gen *frpB*, dessen kodiertes Protein 51 % Identität zu dem Rezeptor des Siderophors Enterobaktin FrpB von *N. gonorrhoeae* zeigt (Carson *et al.*, 1999), wurde ebenfalls unter Eisenmangel verstärkt transkribiert. Allerdings konnten keine Gene bei *M. haemolytica* identifiziert werden, die für Proteine kodieren, die den Transport von Enterobaktin durch das Periplasma und die innere Membran bewerkstelligen. Reissbrodt *et al.* (1994) zeigten, dass *M. haemolytica* nicht auf Enterobaktin als einziger Eisenquelle wächst. Dies könnte dafür sprechen, dass trotz der Transkription des Gens *frpB* auch Enterobaktin keine wichtige Eisenquelle für *M. haemolytica* darstellt. *FrpB* zeigte eine hohe Verstärkung in der Transkription (mehr als 16fach zu allen Zeitpunkten). Daher könnte dieses Gen für ein Protein kodieren, dessen Funktion sich von der derzeitigen Annotation unterscheidet. Im Zusammenhang mit dem Enterobaktin-Rezeptor FrpB ist interessant, dass das Gen *mh1084*, welches für einen potentiellen Regulator des AraC-Typs kodiert, bei Eisenmangel verstärkt transkribiert wurde. MH1084 hat eine Proteinidentität von 29 % zum Regulator BfeR von *Bordetella bronchiseptica*. BfeR verstärkt unter Eisenmangel die Transkription des Enterobaktin-Rezeptors BfeA bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* (Anderson & Armstrong, 2004). Es könnte somit sein, dass bei *M. haemolytica* der Regulator MH1084 unter Eisenmangel die Transkription des Enterobaktin-Rezeptors FrpB verstärkt.

Regulation weiterer Gene für die Aufnahme von Eisen

Neben den Genen für das System FbpABC wurden bei *M. haemolytica* unter Eisenmangel weitere Gene verstärkt transkribiert, die für ABC-Transport-Systeme kodieren, wie z.B. die Gene *yfeABCD*. Die kodierten Proteine von *yfeABCD* haben 71 %, 65 %, 71 % bzw. 60 % Identität zu den Proteinen YfeABCD von *Yersinia pestis* (Bearden & Perry, 1999). YfeA ist ein periplasmatisches Protein, das Eisen durch das Periplasma zu dem Rezeptor-Komplex YfeBC in der inneren Membran transportiert. YfeBC sind die Proteine, die die innere Membran durchspannen und YfeD die Energie liefernde ATPase im Cytosol. Die Eisenquelle, deren Eisen durch das System YfeABCD transportiert wird, ist nicht bekannt.

Die Gene *yfeAB* und *yfeCD* sind bei *M. haemolytica* in zwei benachbarten Operons angeordnet, die in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden. Darin unterscheidet es sich von dem System in *Y. pestis*, denn dort werden die vier Gene in der gleichen Richtung transkribiert. Ob das System für *M. haemolytica* eine Funktion im Infektionsgeschehen hat, ist unbekannt. In *Y. pestis* wird es jedoch für die vollständige Ausprägung der Virulenz benötigt (Bearden & Perry, 1999).

M. haemolytica besitzt die Gene *afuABC*. Diese kodieren für ein weiteres ABC-Transport-System mit Ähnlichkeit zu den Proteinen AfuABC von *A. pleuropneumoniae*. Dieses Proteinsystem in *A. pleuropneumoniae* transportiert Eisen unbekannter Quelle von Rezeptoren der äußeren Membran durch das Periplasma und die innere Membran (Chin *et al.*, 1996). Die Gene *afuABC* von *A. pleuropneumoniae* können *E. coli*-Mutanten, denen das entsprechende System fehlt, das Wachstum unter Eisenmangel ermöglichen (Chin *et al.*, 1996). In der Studie der vorliegenden Arbeit wurden die Gene *afuABC* von *M. haemolytica* unter eisenreichen Bedingungen mit niedrigem Niveau transkribiert, zeigten bei Eisenmangel jedoch keine verstärkte Transkription.

Ein Operon von 4 Genen (*mh0584-mh0587*) wurde in *M. haemolytica* bei Wachstum unter Eisenmangel über alle drei Zeitpunkte verstärkt transkribiert. *Mh0584* hat auf Proteinebene eine Identität von 88 % zu einem Protein von *A. pleuropneumoniae*, das seiner Annotation zu Folge ein periplasmatisches Lipoprotein mit wahrscheinlicher Eisentransport-Funktion ist. *Mh0585* hat mit 84 % ebenfalls eine große Identität auf Proteinebene zu einer eisenabhängigen Peroxidase von *A. pleuropneumoniae*. *Mh0586* und *Mh0587* haben 56 % bzw. 62 % Identität zu einer Fe²⁺/Pb²⁺-Permease von *A. pleuropneumoniae*. So werden Gene, die für Proteine der Eisenaufnahme kodieren, gleichzeitig mit einem Gen transkribiert, das für eine Peroxidase kodiert. Dies ist vermutlich ein Mechanismus, der dazu dient, der Bildung toxischer Hydroxyl-Radikale entgegen zu wirken, die durch einen Anstieg an intrazellulärem Eisen entstehen können.

4.3 Transkriptomvergleich von *M. haemolytica* und *P. multocida* bei Eisenmangel

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkriptome von Rinder-Isolaten von *M. haemolytica* und *P. multocida* bei Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* miteinander verglichen. Ein solcher Transkriptomvergleich ermöglicht die Identifikation von gemeinsamen und speziesspezifischen Unterschieden an die Adaptation an Eisenmangel. Da *M. haemolytica* und *P. multocida* das gleiche Habitat besiedeln und die Versuchsbedingungen zur Bestimmung der eisenabhängigen Transkriptome sowie deren

Analyse gleich waren, wurden mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede erwartet. Bei der Transkriptionsanalyse von *P. multocida* unter Eisenmangel wurden 173 Gene mit veränderter Transkription identifiziert. Davon zeigten 93 Gene eine verstärkte Transkription und 80 Gene eine verminderte Transkription (Tabelle 10 und Tabelle 11). Unter den 42 Genen mit konstant verstärkter Transkription über den untersuchten Zeitraum (Abb. 13) kodieren 16 für Transport- und Bindungsproteine, die an Eisenaufnahme-Prozessen von *P. multocida* beteiligt sind (Tabelle 10). Von den 42 Genen mit konstant vermindelter Transkription unter Eisenmangel kodieren 20 für Proteine des Energie-Stoffwechsels (Tabelle 11). Der in dieser Arbeit durchgeführte Vergleich zwischen den eisenabhängigen Transkriptomen von *M. haemolytica* und *P. multocida* zeigt jedoch weniger Gemeinsamkeiten als erwartet. Von den 1424 Genen der beiden nah verwandten Bakterien, die für Proteine gleicher Funktion kodieren (Kapitel 2.2), waren nur 15 verstärkt und 25 vermindert transkribiert worden (Kapitel 3.4). Zu den 15 Genen mit verstärkter Transkription gehören das Gen eines Hämoglobin-Rezeptors, Gene für ABC-Transportsysteme wie FbpABC und YfeABCD und die Gene für das Energie liefernde System TonB-ExbBD (Tabelle 13). Die 25 Gene mit vermindelter Transkription beinhalten Gene für eisenhaltige Proteinsysteme wie z.B. die Nitrat-Reduktase, die Nitrit-Reduktase und die Fumarat-Reduktase (Tabelle 14). Diese Gene bestätigen das allgemeine Prinzip, dass für Bakterien bei Wachstum unter Eisenmangel beschrieben wird (Andrews *et al.*, 2003). Gene, die für Proteine der Eisenaufnahme kodieren, werden bei Eisenmangel verstärkt transkribiert, während die Transkription von Genen, die für eisenhaltige Proteine kodieren, reduziert wird. Wie wichtig diese Gene im Infektionsgeschehen sind, ist unbekannt, aber es gibt Hinweise auf die Relevanz *in vivo*. Das Gen *hmbR2* von *M. haemolytica* wird in der infizierten Rinderlunge verstärkt transkribiert (siehe Kapitel 3.5.2) und das Gen *hmbR* von *P. multocida* zeigte in Hühnern ebenfalls eine erhöhte Transkription (Boyce *et al.*, 2002). Auch die Gene *yfeBCD* und *hugZ* von *P. multocida* wurden im Kontext einer Infektion nachgewiesen (Boyce *et al.*, 2002). Bosch *et al.* (2002a) zeigten, dass alle drei Gene, die für das Proteinsystem TonB-ExbBD kodieren (*tonB*, *exbB*, *exbD*) für die Virulenz von *P. multocida* notwendig sind.

Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den beiden Pathogenen fällt auf, dass bei *M. haemolytica* die Gene *tbpAB*, *fbpABC*, *tonB* und *exbBD*, die für die Proteine des gesamten Transportwegs für Eisen aus Transferrin kodieren, verstärkt transkribiert wurden. Dagegen zeigten bei *P. multocida* nur die Gene *fbpABC*, *tonB* und *exbBD* eine verstärkte Transkription. Die Oligonukletid-Sequenzen auf dem in dieser Arbeit verwendeten

Mikroarray stammen von dem *P. multocida* Vogel-Isolat Pm70. Die Sequenzierung und Annotation des Genoms des Vogel-Isolats Pm70 (May *et al.*, 2001) hatte gezeigt, dass Pm70 kein kodierendes Gen für einen Transferrin-Rezeptor besitzt. Aus diesem Grund fehlen die Oligonukleotide für das Gen des Transferrin-Rezeptors TbpA auf dem Mikroarray, so dass eine Detektion potentiell vorhandener mRNA des Gens *tbpA* aus dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm *P. multocida* L386 nicht möglich ist. Da Transferrin möglicherweise auch für *P. multocida* eine Eisenquelle in der Rinderlunge darstellt, wurde auf anderem Wege nach einem Gen für den Rezeptor TbpA in dem Stamm *P. multocida* L386 gesucht. Ogunnariwo und Schryvers hatten im Jahr 2001 die Gen-Sequenz für den Transferrin-Rezeptor TbpA aus einem Rinder-Isolat von *P. multocida* veröffentlicht (Ogunnariwo & Schryvers, 2001). Anhand dieser Sequenz wurden *primer* erstellt und mittels PCR die genomische DNA von *P. multocida* L386 auf das Vorhandensein des Gens *tbpA* untersucht. Das Gen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch die *primer*, die von Ewers *et al.* (2006) für den Nachweis von *tbpA* in Rinder-Isolaten von *P. multocida* verwendet wurden, zeigten beim Einsatz in PCRs mit der genomischen DNA von *P. multocida* L386 kein Gen für *tbpA*. In der Studie von Ewers *et al.* (2006) wurden etwa 100 Rinder-Isolate von *P. multocida* mittels PCR auf das Vorhandensein des Gens für den Transferrin-Rezeptor untersucht. Bei nur etwa 70 % der Stämme konnte dieses Gen nachgewiesen werden. Der Stamm L386 gehört vermutlich zu den 30 % der Stämme von *P. multocida*, die keinen Transferrin-Rezeptor besitzen, aber trotzdem die Rinderlunge besiedeln können. So scheint die Relevanz der Aufnahme von Eisen aus Transferrin für *M. haemolytica in vivo* vorhanden zu sein, doch für *P. multocida* ist die Eisenaufnahme aus Transferrin wahrscheinlich weniger relevant.

Es gibt einen zweiten auffälligen Unterschied bei dem Vergleich der Transkriptome. Er liegt bei den verstärkt transkribierten Genen von *P. multocida*, die für Proteine kodieren, die nicht in *M. haemolytica* vorhanden sind. Unter ihnen waren 4 Gene, die für die Aufnahme von Eisen aus verschiedenen Proteinen und Häm des Bluts kodieren. Dies waren die Gene *pfhR* für einen möglichen Hämin-Rezeptor, *pm0337* für ein Hämoglobin-Haptoglobin-Bindungsprotein, *pm1078* für einen weiteren Hämin-Rezeptor sowie *hgbA* für einen weiteren möglichen Hämoglobin-Rezeptor. Bei *M. haemolytica* dagegen wurde kein Rezeptor für den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex verstärkt transkribiert, sondern nur Rezeptoren für Hämoglobin und Hämin (Tabelle 8). Möglicherweise gleichen diese vielen Systeme in *P. multocida* aus, dass nicht alle Stämme von *P. multocida* Rezeptoren für die Aufnahme von Eisen aus Transferrin besitzen. Diese Systeme stehen vermutlich auch

im Zusammenhang mit der systemischen Verbreitung von *P. multocida* im Wirt (Selbitz, 1992), denn die vielfältige Ausstattung von *P. multocida* mit Genen für die Aufnahme von Eisen aus unterschiedlichen Proteinen des Bluts deutet auf die gute Adaptation des Pathogens für diese Eisenquellen hin. Für *M. haemolytica* dagegen wird eine systemische Verbreitung nur selten beschrieben.

Der Vergleich von Mikroarray-Analysen zweier bakterieller Transkriptome muss kritisch betrachtet werden. Es treten häufig große Unterschiede auf, die nicht auf den unterschiedlichen untersuchten Stämmen beruhen, sondern auf den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Ein Beispiel für große Unterschiede im Transkriptom ist die Untersuchung eines Isolats von *Campylobacter jejuni* (NCTC 11168). Das Transkriptom des gleichen Isolats (NCTC 11168) bei Wachstum unter Eisenmangel wurde sowohl von Palyada *et al.* (2004) sowie von Holmes *et al.* (2005) untersucht. Die auftretenden Differenzen im Transkriptionsprofil wurden in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen und in den verschiedenen Wachstumsmedien vermutet (Holmes *et al.*, 2005). Ein Vergleich von Transkriptionsanalysen verwandter Pathogene wie z.B. *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* bei Wachstum unter Eisenmangel ergab ebenfalls große Unterschiede (Ducey *et al.*, 2005). Doch die Versuchsbedingungen zur Herstellung der Transkriptome waren unterschiedlich und diese beiden Pathogene besiedeln nicht das gleiche Habitat (Ducey *et al.*, 2005). Um methodische Unterschiede bei der Transkriptom-Analyse in der vorliegenden Arbeit auszuschließen, wurden *M. haemolytica* und *P. multocida* unter den gleichen Bedingungen kultiviert und die Transkriptome nach dem gleichen Vorgehen analysiert. Ebenso wurde sowohl ein Rinder-Isolat von *P. multocida* als auch ein Rinder-Isolat von *M. haemolytica* verwendet, denn in der vorliegenden Arbeit lag das Interesse im Vergleich zweier nah verwandter Pathogene, die mit der Rinderlunge das gleiche Habitat besiedeln. Von *P. multocida* war zwar bereits von Paustian *et al.* (2001) das eisenabhängige Transkriptom eines Vogel-Isolats analysiert worden, aber da die Versuchs- und Analysebedingungen bei Paustian *et al.* (2001) anders waren als in der vorliegenden Arbeit und das Vogel-Isolat eine systemische Infektion hervorruft und nicht die Lunge besiedelt, sind diese Daten nicht für den Vergleich mit *M. haemolytica* herangezogen worden.

4.4 Verifizierung der Mikroarray-Daten

Die mit der Mikroarray-Technologie erhaltenen Daten wurden mit einer unabhängigen Methode für einige Gene verifiziert, wie es in vergleichbaren Arbeiten von Boyce *et al.* (2002), McHugh *et al.* (2003) und Ducey *et al.* (2005) ebenfalls durchgeführt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine qualitative Verifizierung mit der Northern-Blot-Analyse für drei Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida* durchgeführt. Anschließend wurde eine quantitative Verifizierung für fünf Gene von *M. haemolytica* mittels *real time* PCR durchgeführt.

Mit der Northern-Blot-Analyse konnte die konstante eisenunabhängige Transkription des Kontroll-Gens *recA* bei beiden Bakterien verifiziert werden. Ebenso konnte mit der Northern-Blot-Analyse die bei Wachstum unter Eisenmangel für 15, 30 und 60 min verstärkte Transkription der beiden Gene *fbpA* und *hmbR2* (von *M. haemolytica*) bzw. *hmbR* (von *P. multocida*) bestätigt werden. Der Northern-Blot der beiden Gene *hmbR2* bzw. *hmbR* zeigte neben den erwarteten Banden von 2429 b (*hmbR2*) bzw. 2355 b (*hmbR*) eine zweite Bande bei etwa 1500 b (Abb. 16). Das Vorhandensein von zwei Banden bei diesen beiden Rezeptoren könnte auf einen Abbau der Transkripte zurückzuführen sein, der mit der Mikroarray-Analyse nicht detektiert werden kann. Eine andere Erklärung wäre das Vorhandensein von 2 Gen-Transkripten.

Mit der *real time* PCR wurde quantitativ die transkriptionelle Veränderung der drei Gene von *M. haemolytica* überprüft, deren Transkriptionsprofil schon mit der Northern-Blot-Analyse qualitativ verifiziert wurde (*recA*, *fbpA*, *hmbR2*). Ebenso wurde dies für drei weitere Gene durchgeführt, die bei der Mikroarray-Analyse als verstärkt transkribiert identifiziert wurden (*hmbR1*, *frpB* und *lldD*, das für die L-Laktat-Dehydrogenase kodierende Gen). Für alle untersuchten Gene konnte die verstärkte Transkription unter Eisenmangel mittels quantitativer *real time* PCR verifiziert werden (Tabelle 12). Die Stärke der Transkriptionsänderung war zwischen Mikroarray-Analyse und *real time* PCR unterschiedlich, was nicht ungewöhnlich ist. Bei der Verifizierung von Mikroarray-Daten mit der *real time* PCR in vergleichbaren Studien von Boyce *et al.* (2002); McHugh *et al.* (2003), Ducey *et al.* (2005) und Madsen *et al.* (2006) wurden ebenfalls Unterschiede in den Transkriptionsstärken festgestellt. Auch bei diesen Studien zeigte sich die Tendenz, dass mit der *real time* PCR höhere Transkriptionsunterschiede berechnet werden als mit der Mikroarray-Technologie. Diese Unterschiede könnten auf die höhere Sensitivität der *real time* PCR zurückzuführen sein.

4.5 Gentranskription von *M. haemolytica* *in vivo*

Bei Besiedelung der Rinderlunge trifft das bakterielle Pathogen *M. haemolytica* zunächst auf eine Eisenmangel-Situation. In der vorliegenden Arbeit wurde in einer Mikroarray-Studie durch artifiziell hergestellten Eisenmangel die Infektionssituation *in vivo* simuliert. Um herauszufinden, ob einige ausgewählte der *in vitro* regulierten Gene (Kapitel 3.1) auch *in vivo* bei der Infektion einer Rinderlunge transkribiert werden, wurde Lungengewebe von solchen Rindern untersucht, die mit *M. haemolytica* infiziert worden waren (Kapitel 3.5). Die RNA aus diesem Gewebe wurde mittels RT-PCR analysiert. Dabei konnte für 11 Gene von *M. haemolytica* die Transkription *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 21). Für diese Gene war dies der erste Nachweis *in vivo*. Die vermutete Funktion im Infektionsprozess einiger dieser Gene (*hmbR1*, *hmbR2*, *frpB*, *fbpA*, *mh0651* und *mh0584*) wurde bereits diskutiert (Kapitel 4.2.2). Auch für das in dieser Arbeit als Kontroll-Gen verwendete Gen *recA* konnte die Transkription *in vivo* nachgewiesen werden. Das von Christensen *et al.* (2004) als Haushaltsgen der *Pasteurellaceae* bezeichnete Gen *atpD* wurde bei der Infektion ebenfalls transkribiert, was ein Hinweis auf seine Relevanz *in vivo* sein kann. Die Transkription des Gens *lldD* wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Funktion dieses Gens bei der Infektion ist nicht geklärt, aber bei Eisenmangel *in vitro* gehörte es zu den Genen mit einer sehr hohen transkriptionellen Verstärkung über den gesamten untersuchten Zeitraum (32fach). Eine Funktion bei der Eisenaufnahme *in vivo* haben wahrscheinlich auch die mittels RT-PCR nachgewiesenen Gene *mh1130* und *mh1771*. *Mh1130* kodiert vermutlich für ein eisenbindendes Protein des Periplasmas und das kodierte Protein von *mh1771* hat wahrscheinlich als Teil eines ABC-Transport-Systems die Funktion einer eisenbindenden Permease in der inneren Membran.

Mit der RT-PCR konnte der Nachweis geführt werden, dass eine Transkription dieser 11 Gene von *M. haemolytica* *in vivo* stattgefunden hatte. Es konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Transkription im Vergleich zum Wachstum im Vollmedium BHI *in vitro* verstärkt war. Für zwei dieser Gene, *hmbR1* und *hmbR2*, wurde deshalb mittels *real time* PCR eine Quantifizierung ihrer Transkription *in vivo* durchgeführt (3.5.2). Um ein Maß für die Stärke der Transkription *in vivo* zu haben, wurde die Transkription der gleichen Gene nach 60 min Wachstum unter Eisenmangel *in vitro* aus der Mikroarray-Studie herangezogen (Tabelle 15). Des Weiteren wurden die Werte auf das Transkriptionsniveau von *recA* bezogen, welches keine eisenabhängige Transkription zeigte, um die Vergleichbarkeit der Daten aus der *real time* PCR mit den Daten der Mikroarray-Analyse zu ermöglichen. Die Transkription der Gene *hmbR1* und

hmbR2 wurde *in vivo* um die Faktoren 12 und 13 verstärkt und *in vitro* um die Faktoren 25 und 19. Die ermittelten Faktoren der verstärkten Transkription liegen so nah beieinander, dass vermutet werden kann, dass *M. haemolytica* diese Gene *in vivo* und *in vitro* bei Eisenmangel mit gleicher Verstärkung transkribiert.

Die Ergebnisse der RT-PCR und der quantitativen *real time* PCR mit infiziertem Lungengewebe zeigen, dass die in dieser Arbeit *in vitro* dargestellte Simulation des Eisenmangels tatsächlich einen Aspekt der Infektionssituation *in vivo* widerspiegelt. Des Weiteren deuten sie darauf hin, dass die Hämoglobin-Rezeptoren bei *M. haemolytica* in der infizierten Rinderlunge von Bedeutung sein können. Dies ist nicht auf den ersten Blick einleuchtend, da sich das meiste Hämoglobin in Erythrocyten befindet und nicht auf den Schleimhäuten der Lunge. Jedoch finden sich bei Schädigung der Lunge durch *M. haemolytica* zunehmend Blutzellen in den Alveolen (Jeyaseelan *et al.*, 2002; Intervet Innovation GmbH, unveröffentlichte Daten). Das Leukotoxin von *M. haemolytica* besitzt hämolytische Aktivität (Kapitel 1.1.3; Murphy *et al.*, 1995) und könnte dazu beitragen Hämoglobin aus den Erythrocyten freizusetzen. Damit wäre Hämoglobin für *M. haemolytica* zugänglich und könnte als Eisenquelle dienen. Eine ähnliche Vermutung wurde für *Vibrio cholerae* angestellt. *V. cholerae* produziert bei Eisenmangel nicht nur ein Transportsystem für Häm, sondern auch ein hämolytisches Cytotoxin, das vermutlich zur Freisetzung von Häm oder Hämoglobin aus Zellen beiträgt (Payne, 1993).

4.6 Zur Bedeutung des Gens *fur* in *M. haemolytica*

Das Protein Fur ist bei vielen gramnegativen Bakterien der Hauptregulator des Eisenhaushalts, der auch die Aufnahme von Eisen einschließt (Andrews *et al.*, 2003). Um die von Fur regulierten Gene in *M. haemolytica* bestimmen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit eine *fur*-Deletionsmutante (Δ -*fur*-Mutante) von *M. haemolytica* hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die Prinzipien der doppelten und der einfachen homologen Rekombination angewendet (Kapitel 3.6.2). Mittels doppelter homologer Rekombination sollten neben dem Gen für ein Resistenz vermittelndes Enzym bei einem Ansatz auch FRT-Stellen eingeführt werden und bei einem anderen Ansatz ein von Fur regulierter Promotor zur Kontrolle des Resistenz vermittelnden Enzyms. Nach Elektroporation entsprechender Plasmide in *M. haemolytica* wurde auch getestet, die Bakterien auf Agar-Platten mit verschiedenen Konzentrationen des Eisen-Chelators 2, 2'-Dipyridyl im Medium zu kultivieren. Die Chelatierung des Eisens im Medium sollte einer überhöhten Aufnahme von Eisen der Δ -*fur*-Mutante entgegen wirken, die toxisch für die

Bakterien wäre. Es konnte jedoch keine Δ -*fur*-Mutante hergestellt werden (siehe Kapitel 3.6.2).

Die verwendeten Techniken sind in der Literatur beschrieben und wurden auch bei der Firma Intervet Innovation GmbH zur Herstellung von Mutanten in *M. haemolytica* eingesetzt. Mit dem Prinzip der doppelten homologen Rekombination konnten z.B. bei *A. pleuropneumoniae* (Hsu *et al.*, 2003) und *N. meningitidis* (Delany *et al.*, 2003) Δ -*fur*-Mutanten erzeugt werden. Dabei verblieb eine Antibiotikum-Resistenz-Kassette anstelle des Gens *fur* im Genom. Auch bei *M. haemolytica* wurden mit der doppelten homologen Rekombination schon Mutanten hergestellt (Murphy & Whitworth, 1994). FRT-Stellen zur Entfernung der Resistenz-Kassette in der Mutante (Cherepanov & Wackernagel, 1995) wurden nicht nur bei *E. coli* eingesetzt (Cherepanov & Wackernagel, 1995), sondern beispielsweise auch bei Mutanten von *Mycobacterium smegmatis* (Stephan *et al.*, 2004) und *P. aeruginosa* (Choi & Schweizer, 2005). Bei Δ -*fur*-Mutanten sind bisher keine FRT-Stellen verwendet worden. Das Prinzip der einfachen homologen Rekombination, bei der das gesamte Plasmid mit der Antibiotikum-Resistenz-Kassette anstelle des mittleren Teils des Gens *fur* in das Genom integriert wird, wurde beispielsweise bei *V. cholerae* (Litwin & Calderwood, 1994) und *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2001) angewendet. So ist anzunehmen, dass keine technischen Probleme die Ursache dafür bilden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica* hergestellt werden konnte. In der Tat gestaltete sich die Erstellung einer Δ -*fur*-Mutante bei verschiedenen Bakterien als schwierig. Bei mehreren Bakterien konnte erst nach einigen nicht erfolgreichen Versuchen eine Mutante erstellt werden, wie z.B. bei *N. meningitidis* (Delany *et al.*, 2003) und *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2001). Es gibt jedoch Bakterien, bei denen vermutet wird, dass Fur ein essentielles Protein ist, da sich nur Punktmutationen im Gen *fur* mit herabgesetzter Proteinfunktion oder keine (lebensfähigen) Mutanten herstellen ließen, wie bei *P. aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993), *Neisseria gonorrhoeae* (Thomas & Sparling, 1996), *Haemophilus parasuis* (Bigas *et al.*, 2006) oder *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Haraszthy *et al.*, 2006). Die unspezifischen Punktmutationen im Gen *fur* bei *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* und *A. actinomycetemcomitans* wurden durch Mangan-Selektion erhalten. Diese Methode wurde von Hantke 1987 für die Herstellung einer Δ -*fur*-Mutante in *E. coli* beschrieben. Der Mechanismus ist noch ungeklärt, aber bei Zusatz von hohen Konzentrationen (10 mM) an MgCl₂ in den Agar der Bakterien, können lebensfähige Kolonien entstehen, die eine Mutation im Gen *fur* aufweisen. Es wird vermutet, dass das veränderte Protein Fur in diesen Mutanten teilweise funktionell ist, aber die Transkription

der Eisenaufnahmesysteme nicht mehr so stark reprimiert wie das unveränderte Protein (Haraszthy *et al.*, 2006).

Unabhängig von der vorliegenden Arbeit berichteten Gioia *et al.* (2007), dass es auch ihnen nicht gelungen sei, in *M. haemolytica* eine Δ -*fur*-Mutante zu erzeugen. Weiterhin beschreiben Gioia *et al.* (2007), dass das Gen *fur* unter Eisenmangel nicht verstärkt transkribiert wird, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Sie führen dies auf das Fehlen von Fur-Boxen in der Promotor-Region von *fur* zurück.

Der Misserfolg der Herstellung einer Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica* in dieser Arbeit und bei Gioia *et al.* (2007) lässt vermuten, dass Fur eine essentielle Funktion in *M. haemolytica* übernimmt. Eine potentielle essentielle Funktion eines Gens kann durch einen *antisense*-Ansatz untersucht werden (Rasmussen *et al.*, 2007). Dabei wird das zu untersuchende Gen in *antisense*-Richtung auf einem Plasmid in das Bakterium eingeführt. Die Transkription des Gens in *antisense*-Richtung vom Plasmid und in *sense*-Richtung vom Genom führt zur Bildung von mRNA-Doppelsträngen. mRNA-Doppelstränge werden nicht von den Ribosomen gebunden und es kommt nicht zur Translation (Lewin, 1995), was zu einer reduzierten Konzentration des Proteins im Cytosol führt. Mit einem solchen Ansatz konnte z.B. der Einfluss des Proteins AhpC auf die Virulenz von *Mycobacterium bovis* untersucht werden (Wilson *et al.*, 1998). In *E. coli* wurde mit einem *antisense*-Ansatz die attenuierte Expression des Regulators RpoS untersucht, der an der Adaptation an den Wirt beteiligt ist (Chen *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde ein *antisense*-Ansatz verwendet, um zu prüfen, ob das Gen *fur* in *M. haemolytica* essentiell ist, da sich durch Rekombination keine Mutante herstellen ließ (siehe oben in diesem Kapitel). Der hergestellte *M. haemolytica*-Stamm, der ein Plasmid mit dem Gen *fur* in *antisense*-Richtung trägt, zeigte eine signifikant längere Verdopplungszeit als die Kontrollen (p-Wert 0,002), was auf eine essentielle Funktion des Gens *fur* bei *M. haemolytica* hinweist. Die Frage, ob das Gen *fur* in *M. haemolytica* tatsächlich essentiell ist, kann durch einen *antisense*-Ansatz nicht vollständig beantwortet werden, doch die mit Gioia *et al.* (2007) übereinstimmenden Schwierigkeiten bei der Herstellung einer Δ -*fur*-Mutante in *M. haemolytica* und das verringerte Wachstum der Bakterien in Gegenwart von *antisense*-mRNA deuten stark auf eine essentielle Funktion hin.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal die eisenregulierten Gene von *M. haemolytica* *in vitro* identifiziert und erstmals die eisenregulierten Gene eines Rinder-Isolats von *P. multocida*. Diese Gene stellen einen wichtigen Ausgangspunkt für die Erforschung neuer Medikamente gegen die Bronchopneumonie bei Rindern dar, denn die Eisenaufnahmesysteme dienen der Adaptation an die Umgebung in der Lunge und sind damit für die Infektion von Bedeutung. Medikamente, die in die Eisenversorgung von *M. haemolytica* und *P. multocida* eingreifen, können zur Eindämmung der Bronchopneumonie bei Rindern beitragen. Vermutlich sind jedoch nicht alle in dieser Arbeit identifizierten Eisenaufnahmesysteme von essentieller Bedeutung. Zur Identifizierung der *in vivo* relevanten Aufnahmesysteme müssten Mutanten hergestellt werden, bei denen die Schlüsselproteine der einzelnen Eisenaufnahmesysteme deletiert sind. Wenn die hergestellten Mutanten in Tiermodellen eine attenuierte Virulenz zeigen, wären Zielproteine für die Entwicklung neuer Medikamente gefunden. Hierbei könnte auch nach unterschiedlichen Zielproteinen bei *M. haemolytica* und *P. multocida* gesucht werden, denn die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Unterschiede zwischen den Eisenaufnahmesystemen der beiden Erreger auf. Bei *M. haemolytica* könnte z.B. die Aufnahme von Eisen aus Transferrin untersucht werden. Da der Transferrin-Rezeptor bei *M. haemolytica* *in vivo* eine große Relevanz zu haben scheint, wäre eine Deletionsmutante des Gens *tbpA* von *M. haemolytica* von Interesse.

Für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung beider Pathogene könnte auch die Annotation von Genen vorangetrieben werden. Dabei könnten weitere Proteine als Angriffspunkte für neue Medikamente identifiziert werden. In dieser Arbeit werden homologe Gene der beiden Bakterien identifiziert, deren Proteine eine große Sequenzähnlichkeit besitzen und bei Eisenmangel verstärkt transkribiert wurden, aber deren Proteinfunktion noch nicht bekannt ist, wie *mh0741/pm0064*, *mh0733/pm0612* und *mh0368/pm0679*. Seit der Veröffentlichung des Genoms von *P. multocida* (May *et al.*, 2001) und der Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten Mikroarrays sowie dem veröffentlichten und nur zu einem geringen Teil annotierten Genom von *M. haemolytica* (Gioia *et al.*, 2006) wurden die Genome weiterer nah verwandter Bakterien veröffentlicht, z.B. die Genome von *A. pleuropneumoniae* (Serovar 1), *Mannheimia succiniciproducens* und *Haemophilus somnus*. Sie könnten zur Annotation der Gene mit hypothetischer Proteinfunktion bei *M. haemolytica* und *P. multocida* herangezogen werden. Bei den oben

genannten homologen Genen mit unbekannter Proteinfunktion könnten Deletionsmutanten ebenfalls zur Aufklärung ihrer Funktion beitragen.

Zur weiteren Erforschung des Proteins Fur von *M. haemolytica* könnte auch der für die Eisenmangel-Studie verwendete Mikroarray eingesetzt werden. Der in dieser Arbeit hergestellte Stamm von *M. haemolytica*, der das Gen *fur* in *antisense*-Richtung auf einem Plasmid trägt, zeigte ein verzögertes Wachstum im Vollmedium, das vermutlich auf einer Unterversorgung mit Fur beruht. Von diesem Stamm könnte bei Wachstum in Vollmedium die RNA isoliert, das Transkriptom mit der Mikroarray-Technologie analysiert und mit dem Transkriptom des Wildtyps verglichen werden. Da bei dem Stamm, der das *fur-antisense*-Plasmid trägt, aufgrund der Unterversorgung mit Fur vermutlich nicht mehr alle Gene durch Fur reprimiert sind, könnten, ähnlich wie mit einer Δ -*fur*-Mutante, die Gene bestimmt werden, die einer direkten oder indirekten Regulation durch den Regulator Fur unterliegen. Eine solche Untersuchung könnte zur Identifikation weiterer Gene führen, die an den Adaptationsprozessen in der Lunge beteiligt sind.

Bei einer Mikroarray-Analyse des hergestellten Stammes mit dem Gen *fur* in *sense*-Richtung auf einem Expressionsplasmid könnte gezeigt werden, ob eine verstärkte Transkription des Gens Auswirkungen auf die Eisenregulation hat. Es könnte z.B. gezeigt werden, ob eine verstärkte Reprimierung von Eisenaufnahmesystemen stattfindet. Ebenfalls sollte die Herstellung einer Δ -*fur*-Mutante von *M. haemolytica* weiter verfolgt werden, z.B. mittels Mangan-Selektion (Hantke, 1987), und ebenso die Herstellung einer komplementierten *fur*-Mutante.

Des Weiteren könnten auf bioinformatischem Wege die *contigs* von *M. haemolytica* auf das Vorhandensein von Fur-Boxen untersucht werden. Von besonderem Interesse wären dabei die *contigs*, auf denen Gene liegen, die bei Wachstum unter Eisenmangel eine veränderte Transkription zeigten. Dies würde dazu beitragen zwischen eisenabhängiger und *fur*unabhängiger bzw. eisenabhängiger und *fur*abhängiger Regulation zu unterscheiden. Den ersten Fall stellen die Gene dar, die bei Wachstum unter Eisenmangel verstärkt transkribiert werden, aber keine Fur-Box besitzen.

5 Literatur

- Abdullah KM, Lo RY & Mellors A (1991) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *J Bacteriol* **173**: 5597-5603
- Adhikari P, Berish SA, Nowalk AJ, Veraldi KL, Morse SA & Mietzner TA (1996) The *fbpABC* locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *J Bacteriol* **178**: 2145-2149
- Affymetrix Microarray Suite User's Guide*, Version 5.0, <http://www.affymetrix.com/support/technical/byproductaffx?product=mas>
- Al haj AH, Sawada T, Hatakeyama H, Katayama Y, Ohtsuki N & Itoh O (2004) Invasion of chicken embryo fibroblast cells by avian *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **104**: 55-62
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Ames TR, Markham RJ, Opuda-Asibo J, Leininger JR & Maheswaran SK (1985) Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can J Comp Med* **49**: 395-400
- Anderson JE, Sparling PF & Cornelissen CN (1994) Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *J Bacteriol* **176**: 3162-3170
- Anderson MT & Armstrong SK (2004) The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella enterobactin* utilization genes. *J Bacteriol* **186**: 7302-7311
- Andrews JJ (1997) Atemwegserkrankungen bei Kälbern und Rindern (Teil 1). *VETimpulse* **2**: 18-20
- Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237
- Angen O, Quirie M, Donachie W & Bisgaard M (1999b) Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* **65**: 283-290
- Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE & Bisgaard M (1999a) Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen nov, comb nov, *Mannheimia granulomatis* comb nov, *Mannheimia glucosida* sp nov, *Mannheimia ruminalis* sp nov and *Mannheimia varigena* sp nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 67-86
- Archibald F (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters* **19**: 29-32
- Bahrami F & Niven DF (2005) Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of a single-component haemoglobin receptor and encoding gene. *MicrobPathog* **39**: 45-51
- Baltes N, Tonpitak W, Hennig-Pauka I, Gruber AD & Gerlach GF (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 41-48
- Bearden SW & Perry RD (1999) The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**: 403-414
- Beckstette M, Mailänder JT, Marhöfer RJ, Sczyrba A, Ohlebusch E, Giegerich R & Selzer PM (2004) Genlight: Interactive high-throughput sequence analysis and comparative genomics. *Journal of Integrative Bioinformatics* 2004
- Beddek AJ, Sheehan BJ, Bosse JT, Rycroft AN, Kroll JS & Langford PR (2004) Two TonB systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. *Infect Immun* **72**: 701-708
- Bereswill S, Lichte F, Vey T, Fassbinder F & Kist M (1998) Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 193-200
- Berish SA, Subbarao S, Chen CY, Trees DL & Morse SA (1993) Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **61**: 4599-4606

Literatur

- Bigas A, Garrido MA, Badiola I, Barbe J & Llagostera M (2006) Non-viability of *Haemophilus parasuis fur*-defective mutants. *Vet Microbiol* **118**: 107-116
- Bjorn MJ, Iglewski BH, Ives SK, Sadoff JC & Vasil ML (1978) Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *Infect Immun* **19**: 785-791
- Borkowska-Opacka B & Kedrak A (2002) Expression of iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) by *Pasteurella multocida*, strains isolated from cattle. *Bull Vet Inst Pulawy* **46**: 157-164
- Bosch M, Tarrago R, Garrido ME, Campoy S, Fernandez de Henestrosa AR, Perez de Rozas AM, Badiola I & Barbe J (2001) Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 35-40
- Bosch M, Garrido ME, Llagostera M, Perez de Rozas AM, Badiola I & Barbe J (2002a) Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect Immun* **70**: 5955-5964
- Bosch M, Garrido E, Llagostera M, Perez de Rozas AM, Badiola I & Barbe J (2002b) *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 201-208
- Bosch M, Garrido ME, Perez de Rozas AM, Badiola I, Barbe J & Llagostera M (2004) *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet Microbiol* **99**: 103-112
- Boucher DJ, Adler B & Boyce JD (2005) The *Pasteurella multocida nrfE* gene is upregulated during infection and is essential for nitrite reduction but not for virulence. *J Bacteriol* **187**: 2278-2285
- Boyce JD & Adler B (2000) The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* **68**: 3463-3468
- Boyce JD, Wilkie I, Harper M, Paustian ML, Kapur V & Adler B (2002) Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. *Infect Immun* **70**: 6871-6879
- Boyce JD, Cullen PA & Adler B (2004c) Genomic-scale analysis of bacterial gene and protein expression in the host. *Emerg Infect Dis* **10**: 1357-1362
- Boyce JD, Wilkie I, Harper M, Paustian ML, Kapur V & Adler B (2004b) Genomic-scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within liver tissue of chickens with fowl cholera. *Microbes Infect* **6**: 290-298
- Boyce JD, Lo RYC, Wilkie I & Adler B (2004a) *Pasteurella* and *Mannheimia* in: *Pathogenesis of bacterial infections of animals*. (Gyles C, Thoen C, Prescott J & Songer G (Ed.)) Blackwell Publishing, Iowa, USA: 273-294
- Boyd J, Oza MN & Murphy JR (1990) Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria tox iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5968-5972
- 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 (1997) Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biol Chem* **378**: 779-786
- Braun V & Killmann H (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104-109
- Braun V (2005) Bacterial iron transport related to virulence. *Contrib Microbiol* **12**: 210-233
- Braun V (2006) Energy transfer between biological membranes. *ACS Chem Biol* **1**: 352-354
- Brock TD & Madigan MT (1991) Molecular Systematics and Microbial Evolution in: *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International: 687-693
- Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P & Helmann JD (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**: 189-198

- Bullen JJ, Leigh LC & Rogers HJ (1968) The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea-pigs. *Immunology* **15**: 581-588
- Bullen JJ, Rogers HJ & Lewin JE (1971) The bacteriostatic effect of serum on *Pasteurella septica* and its abolition by iron compounds. *Immunology* **20**: 391-406
- Carson SD, Thomas CE & Elkins C (1996) Cloning and sequencing of a *Haemophilus ducreyi* fur homolog. *Gene* **176**: 125-129
- Carson SD, Klebba PE, Newton SM & Sparling PF (1999) Ferric enterobactin binding and utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **181**: 2895-2901
- Chassy BM, Mercenier A & Flickinger J (1988) Transformation of bacteria by electroporation. *Trends in Biotechnology* **6**: 303-309
- Chen G, Patten CL & Schellhorn HE (2003) Controlled expression of an *rpoS* antisense RNA can inhibit RpoS function in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3485-3493
- Chen WP & Kuo TT (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA *Nucleic Acids Res* **21**: 2260
- Cherepanov PP & Wackernagel W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14
- Chin N, Frey J, Chang CF & Chang YF (1996) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **143**: 1-6
- Choi KH & Schweizer HP (2005) An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMCMicrobiol* **5**: 30
- Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE & Bisgaard M (2004) Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1601-1609
- Chung JY, Wilkie I, Boyce JD & Adler B (2005) Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine* **23**: 2751-2755
- Clarke TE, Tari LW & Vogel HJ (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* **1**: 7-30
- Clinkenbeard KD & Upton ML (1991) Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Am J Vet Res* **52**: 453-457
- Confer AW, McCraw RD, Durham JA, Morton RJ & Panciera RJ (1995) Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Immunol Immunopathol* **47**: 101-110
- Cornelissen CN, Biswas GD, Tsai J, Paruchuri DK, Thompson SA & Sparling PF (1992) Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *J Bacteriol* **174**: 5788-5797
- Cornelissen CN (2003) Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci* **8**: d836-d847
- Cowart RE (2002) Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch Biochem Biophys* **400**: 273-281
- Cox AJ, Hunt ML, Boyce JD & Adler B (2003) Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *MicrobPathog* **34**: 287-296
- Cusack PM, McMeniman N & Lean IJ (2003) The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* **81**: 480-487
- Data Analysis Fundamentals Manual*, http://wwwaffymetrix.com/support/technical/manual/expression_manualaffx
- Davies RL, McCluskey J, Gibbs HA, Coote JG, Freer JH & Parton R (1994) Comparison of outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* expressed *in vitro* and *in vivo* in cattle. *Microbiology* **140**: 3293-3300
- Davies RL (2004) Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology* **150**: 4199-4210

Literatur

- Delany I, Spohn G, Rappuoli R & Scarlato V (2001) The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**: 1297-1309
- Delany I, Ieva R, Alaimo C, Rappuoli R & Scarlato V (2003) The iron-responsive regulator fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **185**: 6032-6041
- Delany I, Grifantini R, Bartolini E, Rappuoli R & Scarlato V (2006) Effect of *Neisseria meningitidis* fur mutations on global control of gene transcription. *J Bacteriol* **188**: 2483-2492
- Deneer HG & Potter AA (1989) Iron-repressible outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. *J GenMicrobiol* **135**: 435-443
- Desai PJ, Garges E & Genco CA (2000) Pathogenic *neisseriae* can use hemoglobin, transferrin, and lactoferrin independently of the *tonB* locus. *J Bacteriol* **182**: 5586-5591
- Diarra MS, Lavoie MC, Jacques M, Darwish I, Dolence EK, Dolence JA, Ghosh A, Ghosh M, Miller MJ & Malouin F (1996b) Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**: 2610-2617
- Diarra MS, Dolence JA, Dolence EK, Darwish I, Miller MJ, Malouin F & Jacques M (1996a) Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl Environ Microbiol* **62**: 853-859
- Dowling A, Hodgson JC, Schock A, Donachie W, Eckersall PD & Mckendrick IJ (2002) Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res Vet Sci* **73**: 37-44
- Ducey TF, Carson MB, Orvis J, Stintzi AP & Dyer DW (2005) Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* **187**: 4865-4874
- Elkins C, Chen CJ & Thomas CE (1995) Characterization of the *hgbA* locus encoding a hemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* **63**: 2194-2200
- Escolar L, Perez-Martin J & de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229
- Ewers C, Lubke-Becker A & Wieler LH (2004) [*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia]. *Berl MunchTierarztlWochenschr* **117**: 97-115
- Ewers C, Lubke-Becker A, Bethe A, Kiebling S, Filter M & Wieler LH (2006) Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol* **114**: 304-317
- Expression Analysis Technical Manual*, http://wwwaffymetrix.com/support/technical/manual/expression_manualaffx
- Fecker L & Braun V (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **156**: 1301-1314
- Ferguson AD, Braun V, Fiedler HP, Coulton JW, Diederichs K & Welte W (2000) Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci* **9**: 956-963
- Foged NT, Pedersen KB & Elling F (1987) Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. *FEMS Microbiol Lett* **43**: 45-51
- Frank GH (1988) When *Pasteurella haemolytica* colonizes the nasal passages of cattle. *Veterinary Medicine* **83**: 1060-1064
- Frey J & Kuhnert P (2002) RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int J Med Microbiol* **292**: 149-158
- Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA & Caswell JL (2006) Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet DiagnInvest* **18**: 18-28
- Garrido ME, Bosch M, Medina R, Bigas A, Llagostera M, Perez de Rozas AM, Badiola I & Barbe J (2003) Fur-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology* **149**: 2273-2281

- Gerlach GF, Anderson C, Potter AA, Klashinsky S & Willson PJ (1992) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **60**: 892-898
- Geschwend G, Feist H & Erler W (1997) [Investigation of outer membrane proteins of *Pasteurella* 2: Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*]. *Berl MunchTierarztlWochenschr* **110**: 386-390
- Gioia J, Qin X, Jiang H, Clinkenbeard K, Lo R, Liu Y, Fox GE, Yerrapragada S, McLeod MP, McNeill TZ, Hemphill L, Sodergren E, Wang Q, Muzny DM, Homsy FJ, Weinstock GM & Highlander SK (2006) The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and *Pasteurellaceae* phylogeny. *J Bacteriol* **188**: 7257-7266
- Gioia J & Highlander SK (2007) Identification and characterization of transcriptional regulation of the *Mannheimia haemolytica* ferric uptake regulator. *Vet Microbiol* **124**: 298-309
- Graham MR & Lo RY (1997) Cloning and characterization of the *exbB-exbD-tonB* locus of *Pasteurella haemolytica* A1. *Gene* **186** : 201-205
- Grass G (2006) Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* **19**: 159-172
- Gray-Owen SD, Loosmore S & Schryvers AB (1995) Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **63**: 1201-1210
- Gray-Owen SD & Schryvers AB (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185-191
- Grifantini R, Sebastian S, Frigimelica E, Draghi M, Bartolini E, Muzzi A, Rappuoli R, Grandi G & Genco CA (2003) Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9542-9547
- Griffin D (1997) Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **13**: 367-377
- Han JH, Stratowa C & Rutter WJ (1987) Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry* **26**: 1617-1625
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol GenGenet* **182**: 288-292
- Hantke K (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol GenGenet* **210**: 135-139
- Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 172-177
- Haraszthy VI, Jordan SF & Zambon JJ (2006) Identification of Fur-regulated genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology* **152**: 787-796
- Harper M, Cox AD, St Michael F, Wilkie IW, Boyce JD & Adler B (2004) A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. *Infect Immun* **72**: 3436-3443
- Harper M, Boyce JD & Adler B (2006) *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* **265**: 1-10
- Heidrich C, Hantke K, Bierbaum G & Sahl HG (1996) Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 253-259
- Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE & Rinehart C (2000) Inactivation of *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* **68**: 3916-3922
- Highlander SK (2001) Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Front Biosci* **6**: 1128-1150
- Holmes K, Mulholland F, Pearson BM, Pin C, McNicholl-Kennedy J, Ketley JM & Wells JM (2005) *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* **151**: 243-257

Literatur

- Houghton SB & Gourlay RN (1984) Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. *Res Vet Sci* **37**: 194-198
- Hsu YM, Chin N, Chang CF & Chang YF (2003) Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae fur* gene and its role in regulation of ApxI and AfuABC expression. *DNA Seq* **14**: 169-181
- Hu SP, Felice LJ, Sivanandan V & Maheswaran SK (1986) Siderophore production by *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **54**: 804-810
- Jacobsen I, Gerstenberger J, Gruber AD, Bosse JT, Langford PR, Hennig-Pauka I, Meens J & Gerlach GF (2005) Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the *in vitro* growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **73**: 3740-3744
- Jaramillo-Arango CJ, Hernandez-Castro R, Suarez-Guemes F, Martinez-Maya JJ, Aguilar-Romero F, Jaramillo-Meza L & Trigo FJ (2008) Characterisation of *Mannheimia* spp strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res Vet Sci* **84**: 7-13
- Jaramillo L, Diaz F, Hernandez P, Debray H, Trigo F, Mendoza G & Zenteno E (2000) Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology* **10**: 31-37
- Jeyaseelan S, Sreevatsan S & Maheswaran SK (2002) Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* **3**: 69-82
- Jin H, Ren Z, Whitby PW, Morton DJ & Stull TL (1999) Characterization of *hgpA*, a gene encoding a haemoglobin/haemoglobin-haptoglobin-binding protein of *Haemophilus influenzae*. *Microbiology* **145**: 905-914
- Kaehler KL, Markham RJ, Muscoplat CC & Johnson DW (1980) Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* **30**: 615-616
- Kammler M, Schon C & Hantke K (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 6212-6219
- Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H & Eguchi M (2007) Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. *Vet J* (Epub ahead of print)
- Kehrenberg C (2000) Molekulare Grundlagen der Tetracyclinresistenz von Isolaten der Genera *Pasteurella* und *Mannheimia*: Identifizierung neuartiger Plasmide und Transposons. Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- Khun HH, Deved V, Wong H & Lee BC (2000) *fbpABC* gene cluster in *Neisseria meningitidis* is transcribed as an operon. *Infect Immun* **68**: 7166-7171
- Kirby SD, Lainson FA, Donachie W, Okabe A, Tokuda M, Hatase O & Schryvers AB (1998) The *Pasteurella haemolytica* 35 kDa iron-regulated protein is an FbpA homologue. *Microbiology* **144**: 3425-3436
- Knippers R (1995) Transkription, Translation und der genetische Code in: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 45-81
- Koster W (2005) Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci* **10**: 462-477
- Kron A (2003) Effektive Therapieregime bei respiratorischen Erkrankungen des Rindes. *Vet-MedReport Sonderausgabe* **V5**: 11
- Lavrrar JL, Christoffersen CA & McIntosh MA (2002) Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**: 983-995
- Lax AJ & Chanter N (1990) Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. *J GenMicrobiol* **136**: 81-87
- Lee BC (1994) Isolation and characterization of the haemin-binding proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **140**: 1473-1480
- Legrain M, Mazarin V, Irwin SW, Bouchon B, Quentin-Millet MJ, Jacobs E & Schryvers AB (1993) Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**: 73-80

- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM & Boedtker H (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751
- Lewin B (1995) *Genes V*. Oxford University Press, Oxford, USA
- Lewis LA, Gray E, Wang YP, Roe BA & Dyer DW (1997) Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **23**: 737-749
- Lila Liste (22. Ausgabe 2007/2008) Das fachliche Verzeichnis der deutschen Tierarzneimittel. *Delta Verlag, www.eurovet.com*
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR & Lockhart DJ (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**: 20-24
- Litwin CM, Boyko SA & Calderwood SB (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**: 1897-1903
- Litwin CM & Calderwood SB (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-149
- Litwin CM & Calderwood SB (1994) Analysis of the complexity of gene regulation by *fur* in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **176**: 240-248
- Lo RY (2001) Genetic analysis of virulence factors of, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* **83**: 23-35
- Lo RY, Sathiamoorthy S & Shewen PE (2006) Analysis of in vivo expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett* **265**: 18-25
- Maciver I, Latimer JL, Liem HH, Muller-Eberhard U, Hrkal Z & Hansen EJ (1996) Identification of an outer membrane protein involved in utilization of hemoglobin-haptoglobin complexes by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **64**: 3703-3712
- Madsen ML, Nettleton D, Thacker EL & Minion FC (2006) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology* **152**: 937-944
- Mahan MJ, Heithoff DM, Sinsheimer RL & Low DA (2000) Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. *Annu Rev Genet* **34**: 139-164
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J (1982) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Mannheim W, Frederiksen W & Mutters R (1992) *Pasteurellaceae* in: *Mikrobiologische Diagnostik*. Burkhardt F (Ed.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 163-171
- Masse E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4620-4625
- May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS & Kapur V (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3460-3465
- McCormick M (1996) Pellet Paint®: A Visible Nucleic Acid Carrier for Efficient, Error-Free Precipitation. *in Novations* **4**: 10-11
- McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE & Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278** : 29478-29486
- McKerral LJ, Lo RY (2002) Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect Immun* **70**: 2622-2629
- Melnikow E, Dornan S, Sargent C, Duzsenko M, Evans G, Gunkel N, Selzer PM & Ullrich HJ (2005) Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under *in vitro* growth conditions mimicking the *in vivo* environment. *Vet Microbiol* **110**: 255-263
- Merrell DS, Thompson LJ, Kim CC, Mitchell H, Tompkins LS, Lee A & Falkow S (2003) Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun* **71**: 6510-6525
- Mey AR, Wyckoff EE, Kanukurthy V, Fisher CR & Payne SM (2005) Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infect Immun* **73**: 8167-8178

Literatur

- Mikael LG, Pawelek PD, Labrie J, Sirois M, Coulton JW & Jacques M (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*flu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **148**: 2869-2882
- Mikael LG, Srikumar R, Coulton JW & Jacques M (2003) *fluA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect Immun* **71**: 2911-2915
- Morck DW, Raybould TJ, Acres SD, Babiuk LA, Nelligan J & Costerton JW (1987) Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica*-A1. *Can J Vet Res* **51**: 83-88
- Morck DW, Watts TC, Acres SD & Costerton JW (1988) Electron microscopic examination of cells of *Pasteurella haemolytica*-A1 in experimentally infected cattle. *Can J Vet Res* **52**: 343-348
- Morck DW, Ellis BD, Domingue PA, Olson ME & Costerton JW (1991) *In vivo* expression of iron regulated outer-membrane proteins in *Pasteurella haemolytica*-A1. *MicrobPathog* **11**: 373-378
- Mosier DA (1997) Bacterial pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **13**: 483-493
- Murphy GL & Whitworth LC (1994) Construction of isogenic mutants of *Pasteurella haemolytica* by allelic replacement. *Gene* **148**: 101-105
- Murphy GL, Whitworth LC, Clinkenbeard KD & Clinkenbeard PA (1995) Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infect Immun* **63**: 3209-3212
- Niven DF, Donga J & Archibald FS (1989) Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol Microbiol* **3**: 1083-1089
- Occhino DA, Wyckoff EE, Henderson DP, Wrona TJ & Payne SM (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol Microbiol* **29**: 1493-1507
- Ochsner UA & Vasil ML (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4409-4414
- Ochsner UA, Johnson Z & Vasil ML (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**: 185-198
- Ogunnariwo JA & Schryvers AB (1990) Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infect Immun* **58**: 2091-2097
- Ogunnariwo JA, Alcantara J & Schryvers AB (1991) Evidence for non-siderophore-mediated acquisition of transferrin-bound iron by *Pasteurella multocida*. *MicrobPathog* **11**: 47-56
- Ogunnariwo JA, Woo TK, Lo RY, Gonzalez GC & Schryvers AB (1997) Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *MicrobPathog* **23**: 273-284
- Ogunnariwo JA & Schryvers AB (2001) Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* **183**: 890-896
- Palyada K, Threadgill D & Stintzi A (2004) Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **186**: 4714-4729
- Panciera RJ, Corstvet RE, Confer AW & Gresham CN (1984) Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J Vet Res* **45**: 2538-2542
- Paustian ML, May BJ & Kapur V (2001) *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. *Infect Immun* **69**: 4109-4115
- Paustian ML, May BJ, Cao D, Boley D & Kapur V (2002) Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *J Bacteriol* **184**: 6714-6720
- Payne SM (1989) Iron and virulence in *Shigella*. *Mol Microbiol* **3**: 1301-1306
- Payne SM (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* **1**: 66-69
- Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M & Stojiljkovic I (2004) Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 154-171

- Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E & Vasil ML (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915
- Posey JE & Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**: 1651-1653
- Postle K & Kadner RJ (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* **49**: 869-882
- Potter AA, Ready K & Gilchrist J (1988) Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1. *MicrobPathog* **4**: 311-316
- Potter AA, Schryvers AB, Ogunnariwo JA, Hutchins WA, Lo RY & Watts T (1999) Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *MicrobPathog* **27**: 197-206
- Prince RW, Storey DG, Vasil AI & Vasil ML (1991) Regulation of *tox*A and *reg*A by the *Escherichia coli fur* gene and identification of a Fur homologue in *Pseudomonas aeruginosa* PA103 and PA01. *Mol Microbiol* **5**: 2823-2831
- Prince RW, Cox CD & Vasil ML (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* **175**: 2589-2598
- Prinz T, Meyer M, Pettersson A & Tommassen J (1999) Structural characterization of the lactoferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **181**: 4417-4419
- Rasmussen LC, Sperling-Petersen HU & Mortensen KK (2007) Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *MicrobCell Fact* **6**: 24
- Raymond KN, Dertz EA & Kim SS (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3584-3588
- Reissbrodt R, Erler W & Winkelmann G (1994) Iron supply of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *J Basic Microbiol* **34**: 61-63
- Remaut E, Tsao H & Fiers W (1983) Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. *Gene* **22**: 103-113
- Ren Z, Jin H, Morton DJ & Stull TL (1998) *hgpB*, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein. *Infect Immun* **66**: 4733-4741
- Rhodes ER, Tomaras AP, McGillivray G, Connerly PL & Actis LA (2005) Genetic and functional analyses of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* AfeABCD siderophore-independent iron acquisition system. *Infect Immun* **73**: 3758-3763
- Robins-Browne RM, Prpic JK (1985) Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **47**: 774-779
- Rowe HA, Knox DP, Poxton IR & Donachie W (1997) Divergent activity and function of superoxide dismutases in *Pasteurella haemolytica* serotypes A1 and A2 and *Pasteurella trehalosi* serotype T10. *FEMS Microbiol Lett* **150**: 197-202
- Ruffolo CG, Jost BH & Adler B (1998) Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol* **59**: 123-137
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook J, Russel D (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sanders JD, Cope LD & Hansen EJ (1994) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **62**: 4515-4525
- Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
- Schiefer B, Ward GE & Moffatt RE (1978) Correlation of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. *Vet Pathol* **15**: 313-321

Literatur

- Schlegel HG (1992) Parameter der Wachstumskurve in: *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 214-216
- Selbitz H-J, Holubek R & Krippner St (2004) Kälbergrippe und Impfung gegen bakterielle Erreger: Fakten und Fiktionen. *Der Praktische Tierarzt* **85**: 192-197
- Selbitz H-J (1992) *Pasteurellaceae* in: *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 124-142
- Shewen PE, Lee CW, Perets A, Hodgins DC, Baldwin K & Lo RY (2003) Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against pneumonic challenge with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vaccine* **21**: 1901-1906
- Shouldice SR, Dougan DR, Williams PA, Skene RJ, Snell G, Scheibe D, Kirby S, Hosfield DJ, McRee DE, Schryvers AB & Tari LW (2003) Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *J Biol Chem* **278**: 41093-41098
- Srikumar R, Mikael LG, Pawelek PD, Khamessan A, Gibbs BF, Jacques M & Coulton JW (2004) Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**: 1723-1734
- Staggs TM, Perry RD (1991) Identification and cloning of a *fur* regulatory gene in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **173**: 417-425
- Stephan J, Stemmer V & Niederweis M (2004) Consecutive gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* using the yeast FLP recombinase. *Gene* **343**: 181-190
- Stojiljkovic I, Hwa V, de Saint ML, O'Gaora P, Nassif X, Heffron F & So M (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**: 531-541
- Straus DC, Unbehagen PJ & Purdy CW (1993) Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* **61**: 253-259
- Tatum FM, Briggs RE, Sreevatsan SS, Zehr ES, Ling HS, Whiteley LO, Ames TR & Maheswaran SK (1998) Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *MicrobPathog* **24**: 37-46
- Thomas CE & Sparling PF (1994) Identification and cloning of a *fur* homologue from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **11**: 725-737
- Thomas CE & Sparling PF (1996) Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **178**: 4224-4232
- Tonpitak W, Thiede S, Oswald W, Baltes N & Gerlach GF (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infect Immun* **68**: 1164-1170
- Torres AG & Payne SM (1997) Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **23**: 825-833
- Touati D (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**: 1-6
- Ungureanu C, Jordache A, Fierlinger U, Lincan C & Coman I (1981) *Pasteurella* infections in respiratory diseases of young cattle. *Arch Exp Veterinarmed* **35**: 453-458
- Veken JW, Shah NH, Klaasen P, Oudega B & de Graaf FK (1996) Binding of host iron-binding proteins and expression of iron-regulated membrane proteins by different serotypes of *Pasteurella multocida* causing haemorrhagic septicaemia. *MicrobPathog* **21**: 59-64
- Wandersman C & Stojiljkovic I (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**: 215-220
- Wandersman C & Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *AnnuRev Microbiol* **58**: 611-647
- Wardman P & Candeias LP (1996) Fenton chemistry: an introduction. *RadiatRes* **145**: 523-531
- Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN & Hooper DC (1984) *Pasteurella multocida* infections Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **63**: 133-154
- Weinberg ED (1978) Iron and infection. *Microbiol Rev* **42**: 45-66

- Whiteley LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, Ames TR & Kannan MS (1992) *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J Vet Intern Med* **6**: 11-22
- Wilson T, de Lisle GW, Marcinkeviciene JA, Blanchard JS & Collins DM (1998) Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* **144**: 2687-2695
- Wooldridge KG & Williams PH (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 325-348
- Wooldridge KG, Williams PH & Ketley JM (1994) Iron-responsive genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of a *fur* homolog. *J Bacteriol* **176**: 5852-5856
- Yates WD (1982) A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* **46**: 225-263
- Yu RH & Schryvers AB (2002) Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochem Cell Biol* **80**: 81-90
- Zecchinon L, Fett T & Desmecht D (2005) How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* **36**: 133-156
- Zhao Q & Poole K (2000) A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 127-132
- Zhou D, Qin L, Han Y, Qiu J, Chen Z, Li B, Song Y, Wang J, Guo Z, Zhai J, Du Z, Wang X & Yang R (2006) Global analysis of iron assimilation and *fur* regulation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 9-17

6 Anhang

6.1 Primer

Tabelle 17 Primer für die Amplifizierung von Sonden bei der Northern-Blot-Analyse

Spezies	Gen	<i>forward</i> Primer (5'→3')	<i>reverse</i> Primer (5'→3')	Größe des PCR-Produkts [bp]
<i>Mh</i>	<i>recA</i> *	ATGCCGAACACGCACTTGATCC	ACGCCTGAACGACGAATATCTAAACG	409
<i>Mh</i>	<i>fbpA</i> *	AAAGGTAAAGTCTGCGTGCCTCAGG	TTTCACCGCGTTTGCTTTATTGG	357
<i>Mh</i>	<i>hmbR2</i> *	TTTAGCGGCGGAGTTAATTATCGG	CGTTCGCTTTTAGGTTTGATTGG	1143
<i>Pm</i>	<i>recA</i>	TAACCCTTCTGTCATTGCGCAAGC	CCCTCTTAATCGCACCCGTACG	478
<i>Pm</i>	<i>fbpA</i>	CGTGAAGGCGAGTTAAGTCCAGC	GCCATCGTGTGCGATCATAGAGG	333
<i>Pm</i>	<i>hmbR</i>	CGCAACCGCTGAAGTGAACAAAACC	CGCCATTGTGAGCCCATTAACG	735

* Diese Primer wurden auch für die RT-PCR dieser Gene verwendet.

Tabelle 18 Primer für die Amplifizierung von Gen-Fragmenten bei der RT-PCR*

Gen	<i>forward</i> Primer (5'→3')	<i>reverse</i> Primer (5'→3')	Größe des PCR-Produkts [bp]
<i>hmbR1</i>	GTCAAGGACACGAAACACAAACAACG	GCCTTGTGTGTATGTGCCGTTTAGG	1247
<i>frpB</i>	GTGGCTCAAACCTGCTTCAACAGATGC	CGGTTTGTGCCGAATTGGTTTACG	593
<i>lldD</i>	CATTATGCGGATGGCGGTTCTTACG	GCCGTCCAAAATTACGAATCC	672
<i>atpD</i>	TGAATAGAGGAACGGTAATGGCAACG	ACACCCGCACCACCGAATAAGC	469
<i>mh1771</i>	CGTATTGCTGCCACATTGCTTGC	GTTATCGCCTCGCACCGTTTCG	673
<i>mh0584</i>	GGCGATTTAGACCCTCGTATTGATGC	AGAGCCGATTTCTGTTGAGAGTTGG	399
<i>mh0651</i>	GAGCAAATTAAGCCAGCGGTATTCC	AGCCCAAAGATACCTTGCGATGC	239
<i>mh1130</i>	CGTGTGTGACACCGGAAGTTTGG	TTCTTGTCCGATAGCCGAATACG	602

* Die Primer für die Gene *recA*, *fbpA* und *hmbR2* befinden sich in Tabelle 17, da sie auch für die Northern-Blot-Analyse verwendet wurden

Tabelle 19 Primer für die Amplifizierung von Standard-templates bei der real time PCR

Gen	<i>forward</i> Primer (5'→3')	<i>reverse</i> Primer (5'→3')	Größe des PCR-Produkts [bp]
<i>recA</i>	TTTACTCGCCACTTCAGG	GTTGGCAGCCGCATTA	928
<i>hmbR1</i>	CAGCTCTCTCCTGTATGGCAAATTGG	CATAGCGCTCTGGAGCAAGGTAACG	808
<i>hmbR2</i>	TTGGGGGGATGAATATGACATTCG	TGGCACAATTTTCGTAGCGTAGATGC	725
<i>fbpA</i>	TTTCACCGCGTTTGCTTTATTGG	ATGAATCCCGGGTCTTACCGCCAGCCTTA	737
<i>frpB</i>	GGTGGTTGCTGAGAATGAAACAGG	GCTGTGTGCAACACCAATACGAGCA	717
<i>lldD</i>	CCAAAGCCGCAGATAACAAAGG	AGCAGGTTTCCACACCGGC	766

Tabelle 20 Primer für die Amplifizierung von Gen-Transkripten bei der *real time* PCR

Gen	<i>forward</i> Primer (5'→3') (in der <i>real time</i> PCR verwendete Konzentration [nM])	<i>reverse</i> Primer (5'→3') (in der <i>real time</i> PCR verwendete Konzentration [nM])	Größe des PCR-Produkts [bp]
<i>recA</i>	GGAACGGTGGAGCAACCTT (300)	TTCGTCGTTTCAGGCGTAGTAAA (900)	93
<i>hmbR1</i>	TGCTCGTGGCAAACGTAATG (300)	AACCTATGCCGAACAATGCTTT (300)	74
<i>hmbR2</i>	CGTTAATTCTGTTGGAGTACGTGAAA (900)	CGAGAAGTTACGTCCAGGTTTCATA (900)	88
<i>fbpA</i>	GGTAAAGTCTGCGTGCGTTCA (900)	TTAAGCCTTCTAAGAATGCTTTGGTTT (900)	109
<i>frpB</i>	GCAACTCGTAGCCCTCGTTT (300)	TCTCCGCTTTAGTATTGCTACCAA (300)	88
<i>lldD</i>	TTTGGTGC GGACGGTATCA (900)	GGCAGAAGAAAAGTACCCCATCTAA (900)	69

Tabelle 21 Primer für die Suche nach dem Gen *tbpA* in *P. multocida*

Primer	Sequenz (5'→3')	Beschreibung	Primer- Kombination
801	TCCTACATTAAGTTTTGCAGATTCGGATTC	1. Primer 5' <i>tbpA</i> Pm	801/802
802	CTTTACCGTTTCCAACCAAGACAAGC	1. Primer 3' <i>tbpA</i> Pm	
803	ATTTCGTTGTGCGCAACGACGGTTC	2. Primer 5' <i>tbpA</i> Pm	803/804
804	GTATTGATTGCCACGGCCGAAACG	2. Primer 3' <i>tbpA</i> Pm	
876	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC	Primer TbPA s (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	876/877
877	TAACGTGTACGGAAAAGCCC	Primer TbPA as (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	
878	AGTTTCTGCGGGATGTTTGTAT	Primer Leu-tRNA s (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	878/879
879	TGCGACAACGGAAATTCCTC	Primer TbPA1 as (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	
880	GGACAGTGCATATAACTTGTTTACTA	Primer TbPA1 (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	880/881
881	ACGATAACTCAGCATAATAGCGCCT	Primer IS1016 as (s. Ewers <i>et al.</i> , 2006)	

Tabelle 22 Primer für die Herstellung der Plasmide pMaha-209 und pMaha-210

Primer	Sequenz (5'→3')	Primer-Kombination (Größe des PCR-Produkts [bp])
556	GCTGCTAGCGCGTAAAATCAGCGGCAATCG	556/559 (2645)
559	GGCACTAGTACTTGCTGTGGCACACCGTTGTC	
557	GCGATATCGGTACCTTCAGACATATATGCCACTTA	557/558 (5390)
558	GCGATATCGGTACCTAACCAACTGTGATGAGAAAA	
134	TCAGGCCTCTAGATCTCAGAGAAAGGGCAACTAT	134/157 (1027)
157	TCAGGCCTCTAGATCTTCAGGCGTAGCACCA	
265	GCGGTACCCGGGCATATGAATATCCTCCTTAGTT	265/266 (1203)
266	ATGGTACCCGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	

Tabelle 23 Primer für die Herstellung des Plasmids pMaha-235 und den Nachweis auf seine Integration ins Genom

Primer	Sequenz (5'→3')	Primer-Kombination (Größe des PCR-Produkts [bp])
628	ATGAATTCGCCTCGTTTACTATCC	628/629 (359)
629	GCGAATTCCAGATATAAACTGTGGTTAGTC	
676	AAATGGTGGAGCAGTTGAAAGAAG	676/677
677	ATACCGAAGACCCAAAGGGACTTC	(581 wt; 5045 Mutante)

Tabelle 24 Primer für die Herstellung des Plasmids pMaha-236 (über pMaha-249)

Primer	Sequenz (5'→3')	Primer-Kombination (Größe des PCR-Produkts [bp])
678	GCGGTCGACATATGTGTATTCAATAACAATAGAC	678/679 (237)
679	ATCGTCGACCATATGGTCTCCTTTTAATTTATAAA	

Tabelle 25 Primer für die Sequenzierung des Inserts in Plasmid pMaha-236

Primer	Sequenz (5'→3')
745	CGTCAGCCTGAATTAACCACTGAACG
746	GGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGG

Tabelle 26 Primer für die Herstellung der Plasmide pMaha-359 und pMaha-356

Primer	Sequenz (5'→3')	Primer-Kombination (Größe des PCR-Produkts [bp])
863	GATTATGACCGGTCTGCTGTGGCACACCGTTG	863/864 (6459)
864	GAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTCGGTTCAGG	
934	GAACTAGTTTACGCCCCGCCCTGC	934/935 (6394)
935	GCACTAGTCTAGAGGCCTGAAGTTCCTATCC	

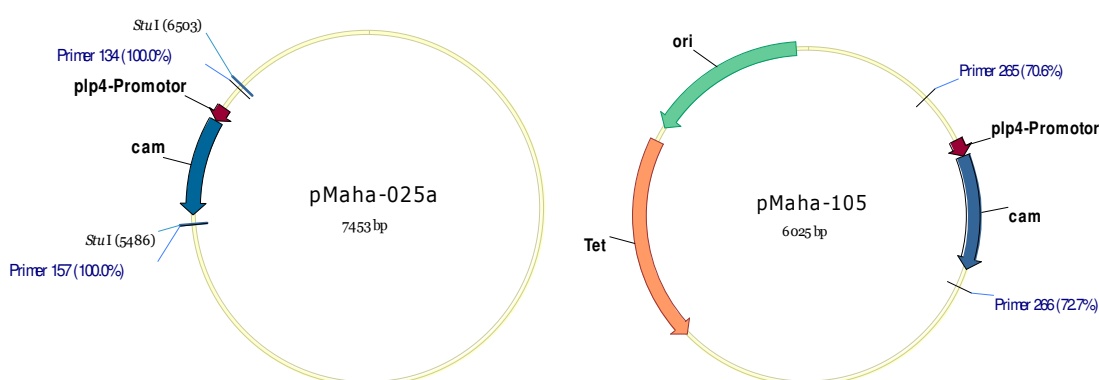
Tabelle 27 Primer für den Nachweis auf eine doppelte homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pMaha-209, pMaha-210 bzw. pMaha-360 und der genomischen DNA von *M. haemolytica*

Primer	Sequenz (5'→3')	Größe des PCR-Produkts [bp]
616	CGTAAATTCTGCTCTTCACCAAACGG	2872(wt), 3501 (pMaha-209), 3665 (pMaha-210), 3617 (pMaha-360)
617	CAGCAGCTCACCTACTTTCGTCAGC	

Tabelle 28 Primer für die Herstellung der Plasmide pMaha-357 und pMaha-358 (über pMaha-343 bzw. pMaha-344)

Primer	Sequenz (5'→3')	Primer-Kombination (Größe des PCR-Produkts [bp])
892	GCTGCTCATATGCTCTGAAGCAAATATTAACG	892/893 (503)
893	GCTGCTAGTACTAAAGGGACTTCGGTAATAG	
894	CGTCGTAGTACTATGCTCTGAAGCAAATATTAACG	894/895 (465)
895	CGTCGTCATATGTTATTTTTTCTCATCACAG	

6.2 Plasmide pMaha-025a und pMaha-105



6.3 Auf dem Mikroarray nicht dargestellte Gene

Tabelle 29 60 Gene von *M. haemolytica*, die nicht auf dem Mikroarray dargestellt sind

Lokus-ID	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins
mh0152	hypothetical protein
mh0153	putative repeat motif protein bdrA8 (~25% fragment)
mh0154	transposase
mh0174	conserved protein of unknown function
mh0177	phage sheath protein (NMB1104)
mh0184	conserved protein of unknown function
mh185	Mu-like prophage flumu defective tail fiber protein
mh0186	hypothetical protein
mh0217	hypothetical protein
mh0232	Shufflon-specific DNA recombinase
mh0270	hypothetical protein
mh0287	conserved protein of unknown function
mh0295	putative repeat motif protein bdrA8 (~25% fragment)
mh0296	hypothetical protein
mh0300	conserved protein of unknown function
mh0301	<i>C. glutamicum</i> protein fragment
mh0436	outer membrane protein P2 precursor
mh0437	insertion element IS1016 transposase (NMA1907)
mh0458	transposase
mh0488	transposase

Lokus-ID	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins
<i>mh0707</i>	<i>aspartate ammonia-lyase, aspartase</i> (EC 4.3.1.1)
<i>mh0927</i>	<i>carbonic anhydrase precursor</i> (EC 4.2.1.1)
<i>mh0928</i>	<i>dethiobiotin synthetase, bioD2</i> (EC 6.3.3.3)
<i>mh0929</i>	<i>biotin synthesis BioC protein (BH3909)</i>
<i>mh0930</i>	<i>conserved protein of unknown function</i>
<i>mh0934</i>	<i>Fkbp-type 22 kDa paptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> (EC 5.2.1.8)
<i>mh0935</i>	<i>probable lipoprotein (possibly associated with proline biosynthesis and virulence)</i>
<i>mh0942</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh0952</i>	<i>putative import inner membrane translocase subunit TIM44</i>
<i>mh1026</i>	<i>50S ribosomal protein L32</i>
<i>mh1035</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1160</i>	<i>sodium/dicarboxylate symporter</i>
<i>mh1383</i>	<i>probable transposase</i>
<i>mh1398</i>	<i>probable transposase</i>
<i>mh1422</i>	<i>L-fucose operon activator</i>
<i>mh1618</i>	<i>TRK system potassium uptake protein</i>
<i>mh1667</i>	<i>capsule polysaccharide modification protein lipA (~60% fragment)</i>
<i>mh1692</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1697</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1741</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1742</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1743</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1744</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1975</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1976</i>	<i>conserved protein of unknown function</i>
<i>mh1977</i>	<i>C. glutamicum protein fragment</i>
<i>mh1981</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh1991</i>	<i>gp42</i>
<i>mh1995</i>	<i>probable transposase</i>
<i>mh1997</i>	<i>IS1016C2 transposase (NMB1411)</i>
<i>mh2062</i>	<i>DNA primase trac, replication primase</i> (EC 2.7.7.-)
<i>mh2063</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>mh2139</i>	<i>Mu-like prophage flumu defective tail fiber protein</i>
<i>mh2140</i>	<i>Hypothetical sequence</i>
<i>mh2265</i>	<i>ADP-ribose pyrophosphatase</i> (EC 3.6.1.13)
<i>mh2270</i>	<i>conserved protein of unknown function</i>
<i>mh2331</i>	<i>phage-related capsid portal protein</i>
<i>mh2332</i>	<i>phage-related terminase, ATPase subunit (GPP)</i>
<i>mh2585</i>	<i>probable transposase</i>
<i>mh2589</i>	<i>Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.17)

Tabelle 30 14 Gene von *P. multocida*, die nicht auf dem Mikroarray dargestellt sind

Lokus-ID	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins
<i>pm0347</i>	<i>ribosomal protein L21</i>
<i>pm1178</i>	<i>ribosomal protein S18</i>
<i>pm1294a</i>	<i>ribosomal protein S16</i>
<i>pm1405</i>	<i>ribosomal protein L14</i>
<i>pm1411</i>	<i>ribosomal protein S19</i>
<i>pm1603</i>	<i>unknown</i>
<i>pm1638</i>	<i>transketolase</i>
<i>pm1729</i>	<i>ABC-type metal ion transport system, permease component</i>

Lokus-ID	Bekannte oder vorhergesagte Funktion des kodierten Proteins
<i>pm1746</i>	<i>GTPases - translation elongation factors</i>
<i>pm1896</i>	<i>glutamate 5-kinase</i>
<i>pm1899</i>	<i>phosphatidylserine decarboxylase</i>
<i>pm1900</i>	<i>adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase</i>
<i>pm1901</i>	<i>7-keto-8-aminopelargonate synthetase and related enzymes</i>
<i>pm1906</i>	<i>ABC-type oligopeptide transport system, ATPase component</i>

6.4 Bakterienkulturen, RNA, cDNA und Mikroarrays

Tabelle 31 Bakterienkulturen und daraus isolierte RNA

Kultur- bzw. RNA-Nr.	Spezies	Wachstumszeit unter Eisenmangel [min]	OD ₅₇₈ bei Zugabe von Dipyridyl	OD ₅₇₈ bei der Ernte	RNA-Konz. [µg/ml]	RNA-Ausbeute [µg]	RNA-Reinheit [A ₂₆₀ /A ₂₈₀]	Verwendung in weiteren Methoden
130	<i>Mh</i>	0	-	0,501	2105	315,7	1,92	NB
135	<i>Pm</i>	0	-	0,204	1106	165,9	1,95	NB
140	<i>Mh</i>	0	-	0,481	1872,6	280,9	2,04	NB
145	<i>Pm</i>	0	-	0,457	1474,6	73,7	1,91	-
150	<i>Mh</i>	0	-	0,498	1164	174,6	1,95	<i>real time</i> PCR
155	<i>Pm</i>	0	-	0,455	1521	228,2	1,97	NB
131	<i>Mh</i>	15	0,433	0,569	724	108,7	2,02	NB
136	<i>Pm</i>	15	0,361	0,501	1632	244,7	1,95	NB
141	<i>Mh</i>	15	0,400	0,550	948,6	142,3	2,08	NB
146	<i>Pm</i>	15	0,337	0,445	899,0	45,0	1,92	-
151	<i>Mh</i>	15	0,342	0,472	1944	291,7	1,97	<i>real time</i> PCR
156	<i>Pm</i>	15	0,338	0,457	1124	168,6	1,96	NB
142	<i>Mh</i>	30	0,313	0,510	1653,0	248,0	2,10	NB
147	<i>Pm</i>	30	0,293	0,460	1594,4	79,7	1,95	NB
152	<i>Mh</i>	30	0,307	0,527	1017	152,6	1,90	NB, <i>real time</i> PCR
157	<i>Pm</i>	30	0,300	0,480	1107	166,2	1,96	NB
378	<i>Mh</i>	30	0,350	0,580	243,6	36,5	2,05	-
380	<i>Pm</i>	30	0,351	0,540	441,6	44,2	0,99	-
133	<i>Mh</i>	60	0,178	0,428	1245	186,8	1,98	NB
138	<i>Pm</i>	60	0,231	0,545	1065	159,7	1,96	NB
143	<i>Mh</i>	60	0,211	0,520	1581,0	237,2	2,10	NB
148	<i>Pm</i>	60	0,198	0,430	1660,6	83,0	1,96	-
153	<i>Mh</i>	60	0,202	0,493	1112	166,9	1,87	<i>real time</i> PCR
158	<i>Pm</i>	60	0,200	0,437	725	108,8	1,96	NB

NB: Northern-Blot-Analyse

Tabelle 32 RNA-Proben von *M. haemolytica* und *P. multocida*, die für die cDNA-Synthese gemischt wurden, synthetisierte cDNA und Mikroarray-Zuordnung

RNA	Wachstumszeit unter Eisenmangel [min]	cDNA-Ausbeute [μg]	cDNA-Reinheit [A_{260}/A_{280}]	Mikroarray	Mikroarray-Bezeichnung
130, 135	0 (Kontrolle)	5,0	1,8	1	Kontrolle_R1_130_135
140, 145	0 (Kontrolle)	5,7	1,8	2	Kontrolle_R2_140_145
150, 155	0 (Kontrolle)	2,9	1,8	3	Kontrolle_R3_150_155
131, 136	15	3,7	1,8	4	15min_R1_131_136
141, 146	15	5,7	1,8	5	15min_R2_141_146
151, 156	15	3,8	1,8	6	15min_R3_151_156
142, 147	30	6,5	1,8	7	30min_R1_142_147
152, 157	30	3,0	1,9	8	30min_R2_152_157
378, 380	30	3,0	1,8	9	30min_R3_378_380
133, 138	60	2,9	1,8	10	60min_R1_133_138
143, 148	60	5,5	1,8	11	60min_R2_143_148
153, 158	60	3,1	1,8	12	60min_R3_153_158

6.5 Qualitätsindikatoren der Hybridisierungen und Replikate

Tabelle 33 Qualitätsindikatoren der einzelnen Mikroarrays

Mikroarray	Wachstumszeit unter Eisenmangel [min]	Noise/ <i>RawQ</i> ¹	<i>Background average</i> ²	<i>Present call</i> [%] ³	<i>Average signal P</i> ⁴	<i>Scaling factor</i> ⁵
1	0 (Replikat 1)	2,33	62,37	86,1	143,9	0,217
2	0 (Replikat 2)	2,24	58,06	85,2	142,3	0,214
3	0 (Replikat 3)	2,27	60,73	88,8	132,8	0,163
4	15 (Replikat 1)	2,40	65,44	86,1	139,2	0,196
5	15 (Replikat 2)	2,23	57,90	85,7	142,5	0,241
6	15 (Replikat 3)	2,29	62,69	91,3	128,8	0,139
7	30 (Replikat 1)	2,23	58,88	85,4	144,2	0,242
8	30 (Replikat 2)	2,18	58,42	86,1	138,8	0,226
9	30 (Replikat 3)	2,21	60,25	89,7	133,0	0,194
10	60 (Replikat 1)	2,39	63,78	88,2	130,5	0,157
11	60 (Replikat 2)	2,40	65,03	87,3	135,0	0,201
12	60 (Replikat 3)	2,22	58,48	87,3	133,6	0,214

¹*Noise/RawQ*: Der durch den Scanner bedingte Rausch-Wert lag bei dem für diese Arbeit verwendeten Gerät zwischen 1,5 und 2,5 und durfte diesen Bereich nicht verlassen.

²*Background average*: Der durchschnittliche Messwert-Hintergrund sollte bei den Signalwerten (*expression values*) zwischen 50 und 70 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) liegen.

³*Present call* [%]: Dieser Wert gab an, welcher prozentuale Anteil der *probe sets* von der Software MAS als transkribiert (*present*) gewertet wurden. Der Wert lag zwischen 85 und 91 %.

⁴*Average signal P*: Der durchschnittliche Signalwert (*expression value*) der von der Software MAS als transkribiert gewerteten *prob esets* lag zwischen 120 und 150 RFU.

⁵*Scaling factor*: Der *scaling factor* für die Normalisierung wurde betrachtet, da er sich zwischen Mikroarrays, die miteinander verglichen werden sollten, nicht mehr als 3fach unterscheiden durfte.

Tabelle 34 Qualitätsindikatoren der Mikroarray-Replikate

Wachstumszeit unter Eisenmangel [min]	verglichene Replikate (siehe Tabelle 33, Spalte 2)	Anteil der <i>probe sets</i> mit einer mehr als 2fachen Veränderung der Signalwerte [%]	Korrelationskoeffizient
0	2 mit 1	0,96	0,990
0	3 mit 1	0,44	0,982
0	3 mit 2	0,16	0,982
15	2 mit 1	0,67	0,989
15	3 mit 1	0,44	0,987
15	3 mit 2	0,49	0,987
30	2 mit 1	0,26	0,981
30	3 mit 1	1,08	0,965
30	3 mit 2	0,77	0,976
60	2 mit 1	0,47	0,974
60	3 mit 1	0,00	0,993
60	3 mit 2	0,09	0,984

6.6 Mit weiteren Methoden untersuchte Gene

Tabelle 35 Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida*, die zusätzlich zur Mikroarray-Studie mit weiteren Methoden untersucht wurden

Spezies	Gen	Lokus-ID	Größe [bp]	Methode(n)
<i>M. haemolytica</i>	<i>recA</i>	<i>mh2285</i>	1107	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>hmbR1</i>	<i>mh0650</i>	2160	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>hmbR2</i>	<i>mh1507</i>	2429	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>fbpA</i>	<i>mh0877</i>	987	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>frpB</i>	<i>mh0980</i>	2103	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>lldD</i>	<i>mh1546</i>	1145	NB, <i>real time</i> PCR, RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	<i>atpD</i>	<i>mh0714</i>	1392	RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	-	<i>mh1771</i>	1104	RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	-	<i>mh0584</i>	861	RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	-	<i>mh0651</i>	867	RT-PCR
<i>M. haemolytica</i>	-	<i>mh1130</i>	900	RT-PCR
<i>P. multocida</i>	<i>recA</i>	<i>pm1817</i>	1065	NB
<i>P. multocida</i>	<i>fbpA</i>	<i>pm0051</i>	1068	NB
<i>P. multocida</i>	<i>hmbR</i>	<i>pm0741</i>	2355	NB

NB: Northern-Blot-Analyse

Tabelle 36 Signalwerte aus der Mikroarray-Studie von den weiter untersuchten Genen

Gen (Spezies)	Lokus-ID	Wachstumszeit unter Eisenmangel [min]	Signalwert Replik 1 [RFU]	Signalwert Replik 2 [RFU]	Signalwert Replik 3 [RFU]
<i>recA</i> (Mh)	<i>mh2285</i>	0	195	208	190
		15	225	228	230
		30	271	190	235
		60	217	268	225
<i>recA</i> (Pm)	<i>pm1817</i>	0	165	158	188
		15	125	148	132
		30	130	157	138
		60	101	109	109
<i>fbpA</i> (Mh)	<i>mh0877</i>	0	209	245	221
		15	1047	1175	926
		30	1310	1104	1233
		60	970	1190	1183
<i>fbpA</i> (Pm)	<i>pm0051</i>	0	138	151	136
		15	536	715	502
		30	765	763	988
		60	663	751	773
<i>hmbR2</i> (Mh)	<i>mh1507</i>	0	17	20	12
		15	373	424	361
		30	413	349	354
		60	334	471	383
<i>hmbR</i> (Pm)	<i>pm0741</i>	0	41	29	39
		15	201	220	247
		30	214	237	196
		60	227	205	237
<i>hmbR1</i> (Mh)	<i>mh0650</i>	0	4	9	4
		15	495	484	454
		30	507	492	526
		60	571	630	584
<i>frpB</i> (Mh)	<i>mh0980</i>	0	35	63	48
		15	1139	1402	1028
		30	1554	1025	1064
		60	984	1305	1022
<i>lldD</i> (Mh)	<i>mh1546</i>	0	17	21	17
		15	703	650	677
		30	679	664	826
		60	517	545	526
<i>fur</i> (Mh)	<i>mh2522</i>	0	183	205	204
		15	208	258	234
		30	266	205	224
		60	192	241	171

Summary

The prokaryotes *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* belong to the causative agents of bovine respiratory disease complex. This severe pneumonia is the most important respiratory disease in cattle and causes enormous financial losses in the cattle industry of Europe and North America. There are vaccines and antibiotics to treat bovine pneumonia, but as they are not very efficient in reducing the prevalence of the disease, new pharmaceuticals are needed.

A prerequisite of successfully colonising the host is the ability of pathogenic bacteria to adapt to the paucity of iron as, like for eukaryotic cells, this metal is also essential for bacterial growth. Because of the necessity to acquire host-derived iron, pharmaceuticals that intervene in the uptake of iron, its intracellular storage or in the regulation of iron uptake could help in reducing pneumonic pasteurellosis.

In order to understand how *M. haemolytica* and *P. multocida* adapt to the paucity of iron microarray technology was used to analyse the response to iron deficiency in a genome wide manner for both pathogens. Growth under iron limitation was chosen since most bacterial genes involved in iron uptake are only transcribed under iron limitation. In this work the *in vitro* iron regulated genes from *M. haemolytica* were identified for the first time and also the iron regulated genes of a bovine isolate of *P. multocida*. The transcriptional profile of a bovine isolate of *P. multocida* was produced to compare two closely related bacteria that colonize the same habitat, the bovine lung. The microarray was a multi-genome microarray and contains the open reading frames of both *M. haemolytica* and *P. multocida*.

The microarray analysis of *M. haemolytica* grown under iron limitation revealed a total of 129 genes with altered transcription. The largest group of genes with induced transcription contained genes encoding several receptors and transporters. Three quarters of them code for proteins involved in iron uptake from different sources like transferrin, haemoglobin, haemin and the xenosiderophores ferrichrome and enterobactin, which reflects the necessity to tap new sources of iron. The largest group of genes with reduced transcription was build by genes encoding iron containing proteins involved in energy metabolism. This result shows that under iron limitation *M. haemolytica* intensifies the transcription of genes encoding proteins for iron uptake, while the transcription of genes coding for iron containing proteins involved in energy metabolism is repressed. This strategy is also observed in other bacteria. For some of the regulated genes intensified transcription was verified using Northern-Blot-Analysis and quantitative real time PCR.

Summary

Analysis of the transcriptome of the bovine isolate of *P. multocida* grown under iron limitation revealed 173 genes with altered transcription. The functional classification revealed that the largest group of genes with intensified transcription belonged to a group of genes coding for proteins involved in transport and binding. Two thirds of these encode proteins with functions in iron uptake. The largest group of genes with down regulated transcription was also found to be involved in energy metabolism.

Comparing the transcriptomes of *M. haemolytica* and *P. multocida* more different than common strategies were shown. Only 40 of 1424 homologous genes had the same direction of transcriptional change (increased or decreased transcription level, respectively). Homologous genes with increased transcription (15) coded for a haemoglobin receptor of the outer membrane (Hmbr2/Hmbr), the ABC-transport systems FbpABC and YfeABCD and the genes coding for the TonB-ExbBD energy transmitting system. Homologous genes with decreased transcription (25) coded for iron containing proteins mostly involved in energy metabolism under anaerobic conditions. They included the genes coding for the nitrate reductase complex NapABCDFGH, the nitrite reductase complex NrfABCD, and the fumarate reductase complex FrdABCD. An obvious difference between the two bacteria was that in *M. haemolytica* genes coding for the entire transport chain of iron derived from transferrin were induced under iron limitation. They comprised of the genes *tbpAB* encoding the receptor complex at the outer membrane, *fbpABC* encoding the ABC transport system through the periplasm and the inner membrane as well as the genes *tonB-exbBD* coding for the system transmitting energy for the transport of iron through the outer membrane. In contrast, the genes encoding the transferrin receptor were not detected in the genome of the bovine isolate of *P. multocida*. This bovine isolate of *P. multocida* seems to belong to the 30 % of bovine isolates that possess no transferrin receptor but nevertheless colonise the bovine lung (Ewers *et al.*, 2006). So, the importance of transferrin as a source of iron seems to be different in *M. haemolytica* and *P. multocida*. A second obvious finding was that in *P. multocida* the induced transcription of several genes encoding proteins for the uptake of iron from serum sources like haem, haemoglobin and haemoglobin-haptoglobin. *M. haemolytica* on the other hand has fewer genes coding for proteins involved in the utilisation of iron from haem or haemoglobin. Possibly, the many possibilities to use haem as an iron source in *P. multocida* compensates for the deficiency in using transferrin as an iron source.

For some genes of *M. haemolytica* with induced transcription *in vitro* the *in vivo* transcription was tested. Transcription of 11 genes induced under *in vitro* iron depletion was detected using RT-PCR in the RNA derived from *M. haemolytica*-infected lung tissue. For the two haemoglobin receptors HmbR1 and HmbR2 a transcriptional increase as compared to the *hmbR1* and *hmbR2* mRNA levels in the inoculum was detected by quantitative *real time* PCR. The level of induction was comparable to the transcriptional change under iron paucity *in vitro* demonstrating that the iron depleted *in vitro* culture conditions mimicked the situation in the bovine lung.

In order to examine the regulation of iron uptake in *M. haemolytica* several attempts were made to produce a mutant lacking the *fur* gene encoding the main regulator for iron uptake. The attempts were not successful, indicating that *fur* may be essential in *M. haemolytica*. A putative function of *fur* for *M. haemolytica* viability was demonstrated by an antisense approach. *M. haemolytica* carrying a *fur*-antisense-plasmid transcribing *fur* in antisense direction grew significantly slower than the control. This hints at an essential necessity of the gene *fur* in *M. haemolytica*. Further evidence for this notion was produced by Gioia *et al.* (2007), who were also unsuccessful in producing a Δ -*fur*-mutant in *M. haemolytica*.

Lebenslauf

Lebenslauf

Susanna Christa Röhrig
geboren am 11. Januar 1970 in Frankfurt am Main

Schulbildung

1976-1980 Grundschule in Offenbach am Main - Rumpenheim
1980-1981 Gymnasium in Offenbach am Main
1981-1987 Gymnasialzweig der Altkönigschule in Kronberg im Taunus
1987-1989 Georg-Büchner-Gymnasium in Bad Vilbel, Abitur 1989

Berufsausbildung

1989-1991 Kaufmännische Ausbildung zur Buchhändlerin in Frankfurt am Main,
Abschlussprüfung 1991

Studium

1991-1997 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt am Main, Hauptfach Biochemie, Nebenfächer Mikrobiologie und
Humangenetik, Diplomprüfung 1996
1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main,
Abteilung „Molekulare Membranbiologie“, mit dem Titel „Versuche zur
Aufreinigung des heterolog exprimierten 5-HT_{5A}-Serotonin-Rezeptors“

Auslandsaufenthalt

1998 Reise durch das südliche und östliche Afrika

Berufserfahrung und Doktorandenzeit

03/1999-04/2003 Associate Scientist in der Firma Intervet Innovation GmbH
05/2003-09/2006 Doktorandenvertrag bei der Firma Intervet Innovation GmbH
09/2006-05/2008 Schreiben der Dissertation
seit 10/2006 Associate Scientist in der Firma Intervet Innovation GmbH

Wissenschaftliche Veröffentlichung

Roehrig SC, Tran HQ, Spehr V, Gunkel N, Selzer PM & Ullrich HJ (2007) *The Response of Mannheimia haemolytica to Iron Limitation: Implications for the Acquisition of Iron in the Bovine Lung.* *Vet Microbiol* **121**: 316-329

Teilnahme an Konferenzen und Poster

European Conference on Prokaryotic Genomes,
5-8 October 2003, University of Göttingen, Germany

„Genomes 2004“, 14th – 17th April 2004,
The Wellcome Trust Conference Centre, Hinxton Cambridgeshire, UK
Abstract and Poster: Roehrig SC, Spehr V, Tran HQ, Ullrich HJ,
The global response of P. multocida and M. haemolytica to iron limited growth conditions

7th International Symposium on Microbial Iron Transport, Storage and Metabolism (MIT),
1-4 June 2005, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
Abstract and Poster: Roehrig SC, Spehr V, Tran HQ, Gunkel N, Selzer PM, Ullrich HJ,
The response of Mannheimia haemolytica to iron limitation

Meine akademischen Lehrer

Biochemie	F. Fahrenholz, H. Fasold, W. Kramer, B. Ludwig, H. Michel
Botanik	J. Feierabend, W. Hilgenberg, F. Koenig, H. Schöller
Chemie	H.-D. Bauer, J. Engels, C. Griesinger, H. Heydtmann, R. Schmidt, W. Sterzel
Humangenetik	A. Starzinski-Powitz
Mathematik und Statistik	K Brändle, K. Hainer
Mikrobiologie	K.-D. Entian, A. Kröger, F. W. Pons, H. Steiger
Pharmakologie	E. Mutschler
Pharmazeutische Biologie	T. Dingermann
Physik	G. Bruls, H. Deitinghoff, W. Grill, W. Martiensen, A. Schaarschmidt, H. Schmidt-Böcking
Physikalische Chemie	H. Rüterjans
Zellbiologie	J. Bereiter-Hahn
Zoologie	G. Fleißner, W. Gnatzy, M. Kunter, U. Maschwitz, R. Prinzing, J. Rheinlaender, E.-A. Seyfarth, B. Streit, W. Volknandt, W. Wiltschko, C. Winter, R. Protsch von Zieten, H. Zimmermann

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei all denjenigen, die mich während meiner Promotion unterstützt und damit zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die immer offenen, freundlichen und motivierenden Gespräche über meine Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Prof. Dr. Paul M. Selzer und **Dr. Joachim Ullrich** danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der vorliegenden Arbeit in der Firma Intervet Innovation GmbH. Joachim danke ich besonders für seinen Einsatz beim Korrekturlesen und Erstellen von Postern und Vorträgen.

Dr. Nikolas Gunkel danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der *Target Discovery*. Niki und seinen Mitarbeitern Monika Borchert-Stuhlträger, Nicole Engelmann, Valérie Frachebois, Dr. Sonja Gerber, Kirsten Hübner, Elena Melnikow, Dr. Carolin Schneider, Dr. Volker Spehr, Sabine Thomas, Dr. Joachim Ullrich, Kathrin Ullrich und Dr. Christian Wolf danke ich herzlich für meine Aufnahme in die Gruppe.

Ein besonderer Dank geht an **Dr. Peter Schmid** und **Dr. Christian Miculka**, die mir ermöglichten die vorliegende Arbeit bei der Firma Intervet Innovation GmbH durchzuführen und mich für diesen Zeitraum von meiner Arbeitsstelle beurlaubten.

Dr. Wolfgang Streber danke ich, dass er für 3,5 Jahre auf meine Arbeitskraft in seiner Gruppe *Lead Discovery* verzichtet hat, um meine Promotion durchführen zu können. Besonders danke ich ihm dafür, dass er mir nicht nur während dieser Zeit als beratender Gesprächspartner zur Verfügung stand.

Dr. Volker Spehr danke ich für seine selbstverständliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Hon Tran danke ich für die freundliche Einführung in verschiedene Computerprogramme und die Zusammenarbeit bei bioinformatischen Aspekten dieser Arbeit.

Kathrin Ullrich danke ich für die Einarbeitung in die praktischen Tätigkeiten der Mikroarray-Technologie und in das „neue“ Labor.

Monika Borchert-Stuhlträger danke ich für das Teilen der kleinen Laborbank.

Nicole Engelmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in Laborangelegenheiten und ihre mich ermunternde gute Laune.

Sabine Thomas danke ich für die gute Nachbarschaft im Labor sowie die hilfreichen Fach- und interessanten Privatgespräche.

Dr. Christoph Reinhart danke ich für seine permanente Ermutigung und das Korrekturlesen.

Dr. Sabine Steffen und **Dr. Christian Steffen** danke ich dafür, dass sie mir in schwierigen Zeiten Zuflucht gewährten und mich wieder aufbauten.

Meinen Eltern, meiner Schwester und ihren Kindern danke ich für die kontinuierliche Aufmunterung und den häufigen Verzicht auf meine Teilnahme am Familienleben.

Jan Steffen danke ich für seine stete Hilfe bei Diskussionen zur Statistik, der Anwendung verschiedenster Computerprogramme und nicht zuletzt für seine nicht endende Zuneigung während der anstrengenden Zeiten der letzten Jahre.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Susanna Christa Röhrig, geboren am 11. Januar 1970 in Frankfurt am Main, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Transkriptionsanalyse zur Identifikation der Eisenaufnahmesysteme von *Mannheimia haemolytica*“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

An keiner anderen Universität habe ich bisher ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Bisher habe ich mich keiner Doktorprüfung unterzogen.

Frankfurt am Main, den 8. Juni 2008