

## Zusammenfassung

*Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella multocida* gehören zu den Verursachern der unter Rindern weltweit verbreiteten Enzootischen Bronchopneumonie. Derzeitige Impfstoffe und Antibiotika gegen diese Bakterien können die Verbreitung der Krankheit nicht maßgeblich einschränken, weshalb Bedarf an neuen Medikamenten besteht.

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

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. 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. 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 Energie-Stoffwechsels vermindert transkribiert werden.

Bei der Analyse des Transkriptoms 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. 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 Transkriptom 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. Unter den 15 homologen Genen mit verstärkter Transkription waren die Gene, die für einen Hämoglobin-Rezeptor, 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, deren kodierte Proteine am Energie-Stoffwechsel 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 Unterschied war, dass bei *M. haemolytica* die gesamten Gene verstärkt transkribiert wurden, deren Proteine an der Aufnahme von Eisen aus Transferrin beteiligt sind. 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). Im Vergleich zu *M. haemolytica* fielen bei *P. multocida* die vielen verstärkt transkribierten Gene auf, die an der Aufnahme von Eisen aus dem Blut 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 die Gene, die für die Hämoglobin-Rezeptoren von *M. haemolytica* kodieren, wurde mittels quantitativer *real time* PCR auch eine Verstärkung der Transkription im 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.

Zur Untersuchung der Regulation des Eisenhaushalts von *M. haemolytica* wurde 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  $\Delta$ -*fur*-Mutante von

*M. haemolytica* sowie das verringerte Wachstum in Gegenwart der *fur-antisense*-mRNA deuten stark auf eine essentielle Funktion dieses Gens hin.