

**Analyse der Wirkmechanismen
antibakterieller Substanzen in *Pasteurellaceae***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Elena Melnikow

Tag der mündlichen Prüfung: 03. März 2009

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. M. Selzer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Duszenko

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Paul M. Selzer und Dr. H. Joachim Ullrich bei der Firma Intervet Innovation GmbH in Schwabenheim in Zusammenarbeit mit dem Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Paul M. Selzer und Herrn Dr. H. Joachim Ullrich für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, für die interessante Themenstellung sowie für die hervorragende stete Unterstützung beim Erstellen dieser Dissertation durch ständige Diskussionsbereitschaft und fachlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich für sein stetes Interesse, die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Mitberichts.

Dem Gruppenleiter Herrn Dr. Nikolas Gunkel danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Firma Intervet Innovation GmbH Schwabenheim für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Ermöglichung der Kooperation mit der Universität Tübingen.

Für die nette Zusammenarbeit und hervorragende Arbeitsatmosphäre danke ich meinen Kollegen in den Abteilungen Target Discovery und BioChemInformatics Mathias Beig, Nicole Engelman, Kristin Engels, Maria Luisa Fernandez Suarez, Dr. Andreas Krasky, Simone Lindauer, Simone Maus-Gilbert, Dr. Frank Oellien, Laura Rodriguez, Dr. Susanna Röhrig, Dr. Andreas Rohwer, Dr. Caroline Schneider, Dr. Jörg Schröder, Sabine Thomas, Dr. Hon Tran, Kathrin Ullrich, Dr. Christian Wolf. Ein spezieller Dank gilt Dr. Richard Marhöfer für die freundschaftliche Unterstützung, Dr. Volker Spehr und Valérie Frachebois für die netten Kaffeestunden und hervorragende fachliche Ratschläge, Michael Schmidt für seine Freundschaft.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Duszenko möchte ich für hervorragende Seminare, die einmalige Arbeitsatmosphäre und viele anregende Gespräche danken. Insbesondere gilt mein Dank Caroline Schönfeld für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Elektronenmikroskopie.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden (Natalie, Walter, Olja, Lada, Igor, Sonja und Stanislaus), da sie mich manches Problem während der letzten Jahre verarbeiten und häufig auch vergessen ließen. Elisabeth Gransche danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen.

Meinen Eltern

When all questions of space, time matter
And the nature of being have resolved,
Only one question remains-

-“Where shall we have dinner?”

Douglas Adams

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die enzootische Bronchopneumonie bei Rindern.....	1
1.1.1	Ökonomische Bedeutung	1
1.1.2	Ätiologie.....	2
1.1.3	Epidemiologie und klinischer Verlauf.....	4
1.1.4	Prophylaxe und Therapie	6
1.2	Pasteurellen.....	9
1.2.1	<i>Mannheimia haemolytica</i>	9
1.2.2	<i>Pasteurella multocida</i>	13
1.3	Neue Perspektiven in der antibakteriellen Forschung.....	16
1.3.1	Einsatz der <i>microarrays</i> in der antibakterieller Forschung.....	17
1.3.2	Referenzkompendium	18
1.3.3	Substanzen des Referenzkompendiums	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material.....	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Enzymsets, Primer.....	24
2.1.3	Puffer, Lösungen	26
2.1.4	Zellkulturmedien	30
2.1.5	Verwendete Bakterienstämme	30
2.1.6	Herstellung des Pasteurellaceae <i>microarrays</i>	31
2.1.7	Computerprogramme	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	32
2.2.2	Kultivierung von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i>	33
2.2.3	Wachstum in Gegenwart von Antibiotika	33
2.2.4	RNA Isolierung von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i>	35
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.6	RNA Gelelektrophorese.....	36
2.2.7	Labelling und Hybridisierung des MPS- <i>microarrays</i>	36
2.2.8	Bioinformatische Auswertung der Affymetrix <i>microarrays</i>	39
2.2.9	Klonierungen	41
2.2.10	DNA-Sequenzierungen.....	43
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion	43
2.2.12	Real-time PCR.....	44
2.2.13	Eisen-Assay	45
2.2.14	Elektronenmikroskopie	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Referenzkompendium globaler Expressionsprofile von <i>P. multocida</i> und <i>M. haemolytica</i>	48
3.1.1	Erstellung und Validierung des Referenzkompendiums	48
3.1.2	Einfluss der Antibiotika des Referenzkompendiums auf das Transkriptom von <i>P. multocida</i>	52
3.1.3	<i>Cluster</i> -Analyse des Referenzkompendiums von <i>P. multocida</i>	55
3.1.4	<i>Fingerprint</i> -Analyse des Referenzkompendiums von <i>P.</i> <i>multocida</i>	56

3.1.5	Regulation der Zielgene in <i>P. multocida</i> durch die Antibiotika des Referenzkompendiums.....	60
3.1.6	Regulation von Signaturgenen in <i>P. multocida</i> durch die Antibiotika des Referenzkompendiums.....	61
3.1.7	Regulation von Stressfaktoren in <i>P. multocida</i> durch die Antibiotika des Referenzkompendiums.....	64
3.1.8	Vergleich der Transkriptomregulation von <i>M. haemolytica</i> und <i>P. multocida</i>	65
3.2	Einfluss der Antibiotika des Referenzkompendiums auf die Transkription von Virulenzgenen.....	74
3.2.1	Virulenzgen Regulation bei <i>P. multocida</i>	74
3.2.2	Regulation der Virulenzgene bei <i>M. haemolytica</i>	79
3.2.3	Phänotypische Charakterisierung der Kapsel von <i>P. multocida</i> nach Antibiotika-Behandlung	80
3.2.4	Einfluss der Reprimierung der Eisentransportgene auf das Bakterienwachstum	84
3.3	Einfluss von Thiazin auf das Transkriptom von <i>P. multocida</i> und <i>M. haemolytica</i>	87
3.4	Einfluss von C-30 auf das Transkriptom von <i>P. multocida</i>	93
4	Diskussion	97
4.1	Referenzkompendium von Antibiotika-induzierten Expressionsprofilen.....	97
4.2	Auswirkungen der Antibiotika auf die Expression der Virulenzgene	108
4.3	Die Transkriptomveränderung durch Thiazin.....	112
4.4	Die Transkriptomveränderung durch C-30.....	113
4.5	Ausblick	114
5	Zusammenfassung	116
6	Literaturverzeichnis.....	119
7	Anhang	132

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsuloxid
kb	Kilobasenpaare
MES	4-Morpholineethanesulfonic acid
MHA	Mueller Hinton II Agar
MHB	Mueller Hinton Bouillon
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
RT-PCR	<i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sp.	Spezies: wissenschaftlicher Ausdruck für die Art; Plural: spp.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tab.	Tabelle
TBS	TrisHCl buffered saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminoethan

1 Einleitung

1.1 Die enzootische Bronchopneumonie bei Rindern

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Bild der Produktion tierischer Erzeugnisse innerhalb der Landwirtschaft fundamental verändert. Kleine, extensiv wirtschaftende Betriebe wurden durch moderne und spezialisierte Intensivbetriebe ersetzt. Diese Entwicklung hat zu einem großen Wachstum in der Produktivität der tierischen Erzeugung geführt. Allerdings änderten sich mit den Haltungsbedingungen auch die Krankheitsbilder in den Tierbeständen. So sind die Erkrankungen der Atemwege bei Rindern von relativ unbedeutenden Einzeltierkrankungen zu den ökonomisch und veterinärmedizinisch wichtigsten Erscheinungen im Rahmen der Mastrindproduktion geworden (Scholz *et al.*, 1987).

Eine der bedeutendsten respiratorischen Erkrankungen bei Rindern ist die enzootische Bronchopneumonie (EBP), die im angloamerikanischen Raum unter den Termini *bovine respiratory disease (BRD) complex* oder *shipping fever* bekannt ist (Apley, 2007). Die EBP wird aufgrund von Erkenntnissen aus den zahlreichen Forschungen aus dem letzten Jahrhundert als eine typische infektiöse Faktorenkrankheit angesehen (Mayr *et al.*, 1986; Dirksen, 1989). Kennzeichnend für die EBP ist eine uneinheitliche Ätiologie mit multifaktorieller Pathogenese, die auf den negativen Wechselwirkungen in dem Erreger-Wirt-Umwelt-Biosystem basiert. Aufgrund dieses mannigfaltigen Charakters der EBP kommt es zu vielfältigen Erscheinungsformen mit klinisch schwersten Verlaufsformen, die sowohl die Prophylaxe- als auch die Therapiemöglichkeiten der tierärztlichen Praxis erschweren (Gründer, 1988). Trotz verbesserter Diagnoseverfahren und Bekämpfungsstrategien stellt die EBP nach wie vor die zentrale und bedeutendste Krankheit in der Rinderzucht und -mast dar. Für die EBP-Behandlung sind bessere therapeutische Möglichkeiten besonders dringend, um die gegenwärtig hohe Verluste zu begrenzen.

1.1.1 Ökonomische Bedeutung

Die EBP ist weltweit verbreitet und insbesondere dort zu finden, wo intensive Rinderhaltung mit gekoppeltem Tiertransport betrieben wird. Es werden jährliche Verluste der Rinderindustrie in Höhe von ca. 3 Milliarden Dollar hauptsächlich in Nordamerika aber auch in Europa gemeldet (Moiser, 1997; Ames, 1997; Griffin, 1997). Diese wirtschaftlichen Verluste entstehen zum

einen durch Todesfälle und verlangsamte Entwicklung der Tiere, sowie durch Therapie- und Tierarztkosten. Abhängig von der Jahreszeit können Morbiditätsraten von 60 bis 100 % und Mortalitätsraten bis zu 20 % auftreten (Schimmel und Kielstein, 1980; Kielstein und Schimmel, 1983; Marschang, 1998; Vogel *et al.*, 2001). Die rasante Entwicklung der Krankheit, die entweder zum Tod der Tiere innerhalb von 24 bis 36 Stunden, oder zu einer chronischen und permanenten Schädigungen der Lunge führt, verlangt nach einer schnellen Diagnose und Therapie.

Weiterhin besitzt die EBP wirtschaftliche Bedeutung durch die hinzukommenden indirekten Verluste, die sich u. a. aus der notwendigen Mehrarbeit (Betreuung kranker Kälber, Desinfektion der Stalleinrichtungen, höherer Futterbedarf) und den geringeren Erlösen aufgrund von geminderter Fleischqualität oder eingeschränkter Leistungsfähigkeit (z.B. Milchleistung oder Mastleistung) ergeben (Abb. 1).



Abb. 1. Zwei gleich alte Kälber in einem Mastbetrieb. Das rechte Tier kündigt wegen chronischer Pneumonie. (Quelle: Klinik für Wiederkäuer, Ludwig-Maximilians-Universität München)

1.1.2 Ätiologie

Die intensiven internationalen Diskussionen und Publikationen der letzten Jahrzehnte belegen eindeutig die Vielschichtigkeit der für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlichen Faktoren und beschreiben die EBP als multifaktorielle Erkrankung (Yates 1982). Somit wird die EBP in erster Linie durch

kombinierte Wirkung unterschiedlicher Krankheitserreger unter Einfluss verschiedener Umweltfaktoren hervorgerufen (Beer 1980).

Mangelnde und unausgewogene Umwelt- und Managementfaktoren, wie die lange Dauer des Tiertransports bei mangelnder Hygiene, überfüllte Ställe und Mastplätze, Schadstoffe und Schadgase sowie Futter- und Tränkeumstellungen sind entscheidend für den Ausbruch und den Verlauf der Erkrankung (Martin *et al.*, 1982; Johnson, 1985; Marschang, 1998; Cusack *et al.*, 2003). Am häufigsten tritt die EBP auf den Mastplätzen (*feedlots*) amerikanischer Mastbetriebe auf, wo viele Tiere aus unterschiedlichen Beständen auf einem engen Raum gehalten werden (Abb. 2) (Wikse, 1985). Durch diese intensive Tierhaltung wird die Ausbreitung der Infektion erleichtert.



Abb. 2. Auf den Mastplätzen (*feedlots*) in den USA. Hier werden Rinder binnen 150 Tagen von 180 kg auf 550 kg gemästet. (Quelle: Intervet Innovation GmbH)

Allgemein geht man davon aus, dass die Erkrankung durch virale Infektion ausgelöst wird, auf die eine sekundäre bakterielle Infektion in der Lunge folgt. Diese Annahme wurde Mitte der 70iger Jahre zum ersten Mal nachgewiesen (Jericho *et al.*, 1976; Jericho & Langford, 1978; Cusack *et al.*, 2003). Die viralen Primärerreger, wie das Parainfluenzae-3-Virus (PI-3), das Bovine Herpes Virus (BHV1) und das Bovine Respiratorische Synzytialvirus (BRSV), schädigen das Lungenepithel und schwächen das Immunsystem durch die Hemmung von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die initiale Virusinfektion ermöglicht bakteriellen Sekundärerregern die Infektion des unteren Respirationstraktes. Diese bakterielle Infektion ist als Hauptursa-

che der klinisch schwersten Verlaufsformen anzusehen (Yates, 1982; Confer *et al.*, 1988; Shoo, 1989; Cusack *et al.*, 2003).

Zu den bedeutsamsten bakteriellen Sekundärerregern im Zusammenhang mit EBP zählen *Mannheimia haemolytica* und zu einem geringeren Grad *Pasteurella multocida*. Beiden Erregern wird eine wesentliche pathogene Rolle im Krankheitsgeschehen zugeschrieben (Schimmel & Kielstein, 1980; Dabo *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007). Als weitere bakterielle Erreger werden hauptsächlich *Histophilus somnus*, *Mycoplasma bovis* sowie weniger häufig *Arcanobacterium pyogenes*, *Moraxella bovis*, Pseudomonaden, *Staphylococcus aureus* und Streptokokken genannt. Allerdings wird über die Bedeutung dieser Erreger bei der Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung sehr kontrovers diskutiert (Collier, 1968; Houghton & Gourlay, 1984; Schulz *et al.*, 1990; Whitley *et al.*, 1992; Mosier, 1997; Kehrenberg *et al.*, 2001; Cusack *et al.*, 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass die EBP ein Ergebnis des synergistischen Zusammenwirkens von Viren, Bakterien und belastenden Haltungs- und Umweltbedingungen ist.

1.1.3 Epidemiologie und klinischer Verlauf

Allgemein unterscheidet man zwei epidemiologische Muster der Erkrankung (Mayr 1990). Die saisonal gebundene EBP tritt gehäuft in den Übergangszeiten des Winters auf, wenn hohe Luftfeuchtigkeit und Kälte zu einer Stresssituation mit zunehmender Schwächung der Immunabwehr beitragen (Ribble *et al.*, 1995a). Die zweite Form der Erkrankung kann ganzjährig bei der gemeinsamen Aufstallung von Tieren aus unterschiedlichen Herkunftsbeständen auf engem Raum in der Regel nach 6-14 Tagen beobachtet werden, was als *crowding*-assoziierte Form bezeichnet wird (Wizigmann *et al.*, 1976; Houghton & Gourlay, 1984; Mayr, 1990). Bei dieser Form ist oft ein *crowding*-typischer Morbiditätsgipfel zu beobachten, der in der zweiten bis vierten Woche nach dem Zusammenstellen der Tiere auftritt (Ribble *et al.*, 1995a, b).



Abb. 3. An EBP erkranktes Rind mit typischen Symptomen wie wässrige Augen- und Nasenausfluss. (Quelle: Intervet Innovation GmbH)

Die klinische Symptomatik bei Einzeltieren ist aufgrund der Variabilität der involvierten ätiologischen Komponenten heterogen (Yates, 1982). Trotzdem lassen sich Leitsymptome für klinisch manifeste Verlaufformen wie folgt festlegen (mod. nach Marschang, 1998):

- Fieber mit Anstieg der Rektaltemperatur (von 38,6 auf 41,5°C),
- Fress- und Tränkunlust/ Anorexie,
- Apathie,
- Tachykardie,
- Tachypnoe, Dyspnoe (anfangs inspiratorisch, später expiratorisch),
- Auskultatorisch feststellbare Rasselgeräusche, Husten,
- Nasenausfluss (anfangs serös, später purulent),
- Augenausfluss,
- schaumiger, schleimiger Maulausfluss.

Die plötzlich auftretenden Respirationsstörungen gelten als erstes Hauptsymptom für die entstehende Krankheit (Abb. 3) (Berchtold *et al.*, 1990; Selbitz, 1992). Das erste akute Stadium der Erkrankung mit mäßig gestörtem Allgemeinbefinden und den hinzukommenden aufgeführten Leitsymptomen kann sich zu einer chronischen Bronchopneumonie entwickeln. Dabei magern die Tiere stark ab, sind matt, leiden stetig unter Atemnot und haben zeitweise Fieber. In solchen Fällen verenden die meisten Tiere in der Regel nach ein

paar Wochen trotz der Therapie (Wizigmann *et al.*, 1976; Berchtold *et al.*, 1990).

1.1.4 Prophylaxe und Therapie

Zur erfolgreichen Prophylaxe und Therapie der EBP steht bis heute weltweit kein absolut effizientes Behandlungskonzept zur Verfügung (Dirksen, 1987; Radostitis & Littlejons, 1988; Griffin, 1997). Aufgrund des komplexen Kausalitäts- bzw. Pathogeneseprofils der EBP nehmen vorbeugende Maßnahmen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung entsprechender Krankheitsprozesse ein. Diese vorbeugenden Maßnahmen lassen sich prinzipiell in nicht-immunprophylaktische Maßnahmen und spezifische immunologische Prophylaxemaßnahmen differenzieren (Johnson, 1985; Confer, 1993; Mosier, 1997; Wieler & Baljer, 1999, Berry *et al.*, 2004). Zu den nicht-immunprophylaktische Maßnahmen zählt z.B. eine Optimierung der Tierhaltung:

- Einhaltung einer sorgfältigen Fütterungspraxis,
- Vermeidung abrupter Futterumstellungen,
- regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Stallungen,
- Einhaltung eines für die jeweiligen Tiere angemessenen Stallklimas,
- schonende Tiertransporte,
- Vermeidung zu enger Aufstallung der Tiere,
- Einhaltung der getrennten Aufstallung zugekaufter Tiere,
- Absonderung kranker und krankheitsverdächtiger Tiere,
- regelmäßige Überprüfung des Gesundheitszustandes und der parasitären Belastung der Tiere.

Ein bestmögliches Impf-Programm (Tab. 1) gehört zu den spezifischen immunologischen Prophylaxemaßnahmen. Nur eine optimale Kombination dieser Maßnahmen ermöglicht spürbare und beständige Erfolge bei der Bekämpfung der EBP des Rindes (Mayr, 1980; Mosier *et al.*, 1989, 1995, 1998; Kirkpatrick *et al.*, 2008).

Tabelle 1. Spezifische immunologische Prophylaxemaßnahmen gegen die EBP (ANON, 2000).

Handelsname (Hersteller)	Impfantigene/ Inhaltstoffe
Bovigrip RSP plus (Intervet Innovation GmbH)	<i>M. haemolytica</i> Typ A1, Parainfluenza-3-Virus, BRS-Virus
Bovilis IBR (Intervet Innovation GmbH)	BHV1 (IgE)
Mabovac (Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH)	<i>M. haemolytica</i> Serotyp A1, A6
Multigal-Serum (WdT)	Equine Immunglobuline
Pastobov (Merial GmbH)	<i>M. haemolytica</i> Typ A1 Leukotoxoid
Rispoval Pasteurella (Pfizer Pharma GmbH)	<i>M. haemolytica</i> Serotyp A1
Tecvax Pasteurella 1/6 (Vétoquinol Chassot GmbH)	<i>M. haemolytica</i> Serotyp A1, A6

Eine Therapie gegen die viralen Erreger der EBP ist nicht möglich. Der Einsatz von Antibiotika steht neben der Anwendung von kommerziellen Vakzinen im Zentrum aller therapeutischen Maßnahmen gegen die verschiedenen bakteriellen Sekundärerreger der EBP (Tab. 2) (Walser & Bosted, 1990; Biberstein, 1990; Hofmann, 1992; Rolle & Mayr, 1993; Radostits *et al.*, 2000; Rolle & Mayr, 2002; Sweeney *et al.*, 2008). Ceftiofur, Tulathromycin, Tilmicosin und Florfenicol werden am häufigsten für die Therapie der EBP verwendet und sind die meist verkauften Antibiotika in den USA (Abb. 4) (Cusack *et al.*, 2003). Alle diese Antibiotika haben eine sehr hohe Wirksamkeit gegen die EBP und führen zur schnellen Linderung der klinischen Symptome. Der Therapieerfolg ist abhängig von der Empfindlichkeit der Bakterien und vom Stadium der Erkrankung. Bei frühzeitiger Erkennung und rechtzeitiger Applikation von Antiinfektiva in adäquater Dosierung heilen die Lungenveränderungen meist völlig ab. Insbesondere Tilmicosin hat eine bewährte Wirkung als Einzeldosis-Applikation zur Prophylaxe nach der Ankunft der Rinder in den Mastbetrieben sowie zur therapeutischen Behandlung der an EBP erkrankten Tiere (Ose & Tonkinson, 1988; Musser *et al.*, 1996). Außerdem wurde die Anzahl der Todesfälle durch EBP und die Symptomatik durch die Behandlung mit Tilmicosin verbessert (Vogel *et al.*, 1998). Florfenicol und Ceftiofur bewirken die Minderung der Anzahl an Rückfällen und an Todesfällen (Apley, 1997; Booker *et al.*, 1997). Ein weiteres Antibiotikum, Enrofloxacin, hat ebenfalls

sehr große Erfolge in der Behandlung von enzootischen Bronchopneumonie in Europa und USA gezeigt (Robb *et al.*, 2007).

Tabelle 2. Für die Therapie von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Infektionen auf dem Markt verfügbare antimikrobielle Präparate.

Wirkstoff	Handelsname (Hersteller)
Ceftiofur	Excede (Pfizer, Inc.), Naxcel (Pfizer, Inc.)
Cefquinom	Cobactan (Intervet Innovation GmbH)
Danofloxacin	A180 (Pfizer)
Enrofloxacin	Baytril (Bayer)
Erythromycin	Erythro®-100, 200, Gallimycin® Injectable (Cross Vetpharm Group Ltd.)
Florfenicol	Nuflor (Schering-Plough)
Oxytetracycline	Biomycin (Boehringer), Tetradure (Merial), Terramycin (Pfizer, Inc.)
Penicillin G (Procaine)	Pro-Pen G (Cross Vetpharm Group Ltd., IVX Animal Health, Inc.)
Tilmicosin	Micotil (Elanco)
Tulathromycin	Draxxin (Pfizer)
Tylosin	Tylan®100, Tylosin® (Elanco Animal Health, A Division of Eli Lilly & Co.)

Die medikamentöse Prophylaxe ist eine gängige und seit vielen Jahren praktizierte Strategie in den USA, bei der die in den *feedlots* ankommenden Tiere unterschiedlicher Herkunft mit Antibiotika behandelt werden (Frank *et al.*, 2002). Eine weitere gängige Praxis ist die metaphylaktische Behandlung der gesamten Herde, die beim Auftreten von EBP Einzelfällen in der Herde angewendet wird, um die Ausbreitung der Infektion in der Herde zu vermeiden.



Abb. 4. Für die EBP Therapie in USA am häufigsten eingesetzte Antibiotika. (A)-Excede (Ceftiofur) von Pfizer, Inc., (B)- Draxxin (Tulathromycin) von Pfizer, (C)- Micotil (Tilmicosin) von Elanco, (D)- Nuflor (Florfenicol) von Schering-Plough.

Das Vorkommen von Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika bei der Behandlung von EBP ist regional-spezifisch und beruht auf regional unterschiedlichen Anwendungspräferenzen einzelner Wirkstoffe (Trolldenier, 1995; Hörmansdorfer & Bauer, 1996; Kehrenberg *et al.*, 2001; Catry *et al.*, 2005). So treten in Australien nur sehr selten Resistenzfälle auf, wobei Resistenzen gegen Streptomycin und Penicillin am häufigsten sind (Apley, 1997; Apley *et al.*, 1998; Cusack *et al.*, 2003). Im Vergleich dazu sind in Nordamerika insbesondere Resistenzen gegen Penicillin, Tetracyclin und Tilmicosin sehr verbreitet. In Frankreich und Deutschland sind die meisten Erreger weiterhin empfindlich gegen Enrofloxacin, Tilmicosin, Tylosin, Erythromycin und Ampicillin (Radostits, 2004; Wallmann *et al.*, 2004; Duff & Galyean 2007).

1.2 Pasteurellen

Die zur Familie *Pasteurellaceae* gehörenden Keime *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella multocida* sind die Haupt-Erreger der EBP des Rindes und weisen die absolute Priorität im Krankheitsgeschehen auf (Schimmel & Kielstein, 1980; Yates *et al.*, 1983; Panciera & Corstvet, 1984; Dabo *et al.*, 2007). Im Folgenden soll detailliert auf die unterschiedlichen Serotypen und wichtigsten Virulenzmechanismen eingegangen werden.

1.2.1 *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica (früher: *Pasteurella haemolytica*) ist seit 1999 eine eigene Gattung der Gram-negativen Familie der *Pasteurellaceae* und hat

vorwiegend eine große Bedeutung als Krankheitserreger von Wiederkäuern (Abb. 5) (Whiteley *et al.*, 1992; Angen *et al.*, 1999). Außer der EBP des Rindes ruft *M. haemolytica* weitere Erkrankungen, wie Mastitis und septikämische Erkrankungen bei Wiederkäuern hervor.

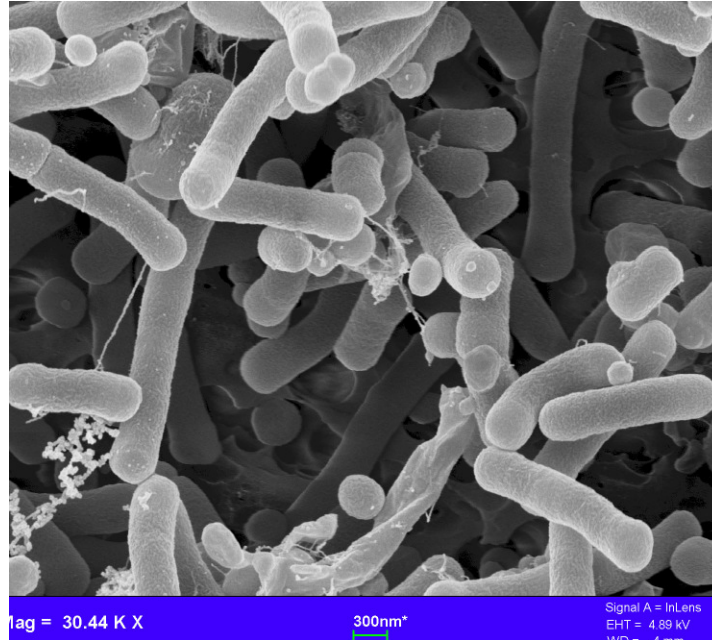


Abb. 5. Raster elektronenmikroskopische Aufnahme von *Mannheimia haemolytica* M7/2. (Quelle: Freie Universität Berlin, Prof. Dr. L. H. Wieler).

Auf der Grundlage extrahierbarer Kapsel-Antigene wurde *M. haemolytica* in 12 Serotypen (A1, A2, A5-9, A12-14, A16 und A17) eingeteilt (Angen *et al.*, 1999). Die Serotypen A1 und A2 sind weltweit verbreitet und der Serotyp A6 wird zunehmend in den USA und in Großbritannien festgestellt (ca. 30 %) (Purdy *et al.*, 1997; Al-Ghamdi *et al.*, 2000). Vor allem die Serotypen A1 und A6 wurden als bedeutendste bakterielle Erreger der EBP bei Rindern beschrieben, während die Infektionskrankheiten bei Schafen überwiegend durch die Serotypen A2, A5-7 verursacht werden (Quirie *et al.*, 1986; Angen *et al.*, 1999).

M. haemolytica kolonisiert den Nasen-Rachen-Raum der gesunden Tiere. Setzt durch die bereits beschriebenen Stressfaktoren eine Immunsuppression ein, vermehren sich die Bakterien explosionsartig (Frank *et al.*, 1989, 1996; Allen *et al.*, 1991). Beim Einatmen gelangen die Erreger dann mit der Atemluft in den unteren Atmungsstrakt und besiedeln die Bronchien und die Lunge, wo sie entzündlichen Reaktionen und die daraus resultierenden massiven Schädigungen des Lungengewebes hervorrufen (Abb. 6).

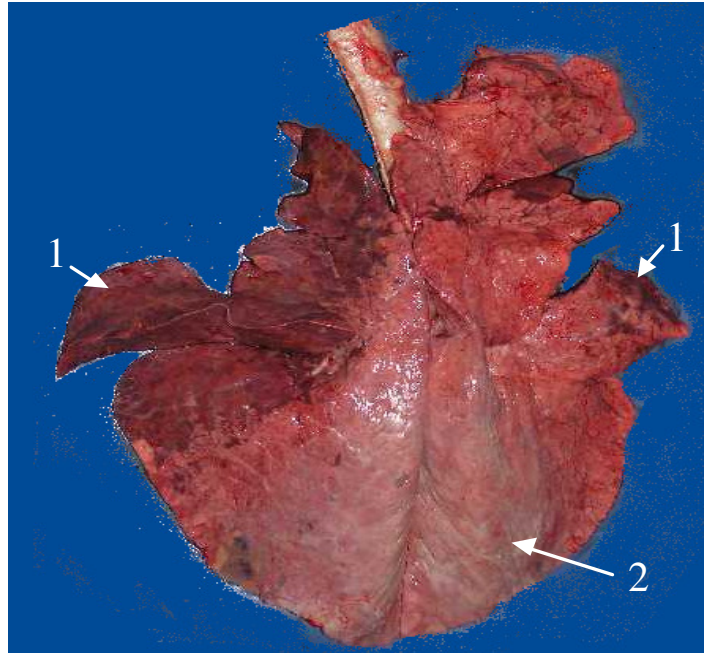


Abb. 6. Eine mit *M. haemolytica* experimentell infizierte Rinderlunge. 1) Die cranialen, posterior cranialen und ein Teil der caudalen Bereiche des linken sowie ein medialer Teil des rechten Lungenlappen zeigen erkranktes und geschädigtes Gewebe. 2) Gesundes Lungengewebe. Mit freundlicher Genehmigung von Intervet Innovation GmbH. Foto: B. Sander.

Während die pathologischen Veränderungen des Erregers *M. haemolytica* in der Literatur eingehend beschrieben wurden (Yates, 1982), steht für viele Virulenzfaktoren die endgültige Aufklärung ihrer Rolle im Infektionsprozess noch aus (Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004a; Zecchinon *et al.*, 2005). Als Virulenzfaktor kann gemeinhin jede Verbindung bezeichnet werden, die durch ein Pathogen synthetisiert wird und essentiell für das Auslösen einer Krankheit in einem Wirt ist (Domingue & Woody, 1997; Finlay & Falkow, 1997; Wassenaar & Gaastra, 2001). Der Infektionsprozess und die vermutlich daran beteiligten Virulenzfaktoren lassen sich weitgehend in drei Phasen zusammenfassen:

1. *Adhäsion.* Bislang ist der genaue Ablauf der Anheftung des Erregers an das respiratorische Epithel, welche den ersten Schritt im infektiösen Prozess darstellt, noch nicht ausreichend untersucht worden (Ewers *et al.*, 2004a). Es wird aber angenommen, dass an der Adhäsion mehrere Virulenzfaktoren, wie das Serotyp-spezifische Antigen Ssa1, Fimbrien und andere wenig charakterisierte Adhäsionsfaktoren, involviert sind (Potter *et al.*, 1988; Lo *et al.*, 1991; Jaramillo *et al.*, 2000). Zusätzlich sind Membranproteine (*outer membrane proteins*, OMP) bedeutend für die Adhärenz-Induktion. Das wird durch den *in vitro* Nachweis eines hohen Bindungsvermögens der OMP-Fraktion von *M.*

haemolytica an bovine Trachealepithelzellen bzw. Trachealmuzin unterstrichen (Botcher *et al.*, 1993).

2. *Adaptation und Proliferation.* *M. haemolytica* sezerniert eine Neuraminidase, die vermutlich die Viskosität des respiratorischen Schleimes reduziert (Jeyaseelan *et al.*, 2002). Eine weitere Funktion der Neuraminidase ist das Herabsetzen der negativen Ladung auf der Oberfläche der Epithelzellen durch die Abspaltung von Sialinsäuren von Glycoproteinen. Dadurch wird wahrscheinlich ein tieferes Eindringen der Bakterien in das respiratorische Epithel und ein intensiverer Kontakt zur Zelloberfläche ermöglicht. Des Weiteren nimmt das Eisenakquirierungssystem eine zentrale Rolle in dieser Phase des Infektionsprozesses ein (Graham & Lo, 1997; 2002; Kirby *et al.*, 1998; Röhrig *et al.*, 2007). Das Transferrin-bindende Protein 1 und 2, das Rezeptorprotein TonB, sowie das Eisenbindungsprotein FbpABC werden als Schlüsselprotein bei der Eisenakquirierung dieser Spezies angesehen (Ewers *et al.*, 2004a). Dieses System ermöglicht eine kontinuierliche Versorgung von *M. haemolytica* mit Eisen, das als Cofaktor an zahlreichen metabolischen Prozessen für die Etablierung und Proliferation von *M. haemolytica* und letztendlich für die Entfaltung seiner Virulenz essentiell ist. Zudem ist ein Porin Protein der äußeren Membran, PomA, nachweislich entscheidend am Nährstofftransport beteiligt (Mahasreshti *et al.*, 1997; Highlander 2001).

3. *Immunsystem-Inaktivierung und pathogene Wirkung.* Um zu überleben, muss auch der Erreger den verschiedenen Abwehrmechanismen des Wirtes widerstehen. Dafür setzen die Bakterien das Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) und das Leukotoxin (LKT) frei, die in diesem Stadium des Infektionsprozesses als die Hauptvirulenzfaktoren bezeichnet werden können (Jeyaseelan *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004a). Beide Toxine regen Makrophagen und Epithelzellen zur Sekretion von Zytokinen an und entfalten dadurch die inflammatorische Wirkung. Bei hohen Konzentrationen wirkt LKT zytotoxisch und verursacht die Lyse der bovinen, caprinen und ovinen Leukozytenfraktionen (Berggren *et al.*, 1981; Shewen u. Wilkie, 1982; Confer *et al.*, 1990a, 1990b; Whiteley *et al.* 1992). Zusätzlich liefern Katalase und die Superoxid-Dismutasen A und C einen partiellen Schutz vor der Abtötung durch oxidative Substanzen (Kroll *et al.*, 1991; 1995; Lainson *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1997). Des Weiteren entsteht ein Schutz gegen spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen des Immunsystems des Wirts durch die Polysaccharid-Kapsel. Sie vermittelt z.B. eine Resistenz gegen Serum-Komponenten durch die Inhibition der Komplementkaskade, die auch zur Verminderung der Phagozytose

durch neutrophilen Granulozyten führt (Chae *et al.*, 1990; McKerral & Lo, 2002; Taylor & Roberts 2005).

Die meisten dieser Erkenntnisse wurden durch *in vitro* Experimente gewonnen, von denen nur wenige, wie z. B. über LKT, durch *in vivo* Infektions-Experimente verifiziert und ausreichend erforscht wurden (Paulsen *et al.*, 1989; Tatum *et al.*, 1994; Saban *et al.*, 1997; Tatum *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999). Um aber ein klares Bild der EPB-Pathogenese zu skizzieren, fehlt bislang das Verständnis des komplexen Regulationsvorgangs aller Virulenz-assoziierten Faktoren.

1.2.2 *Pasteurella multocida*

In der Veterinärmedizin ist *Pasteurella multocida* seit über 100 Jahren als Krankheitserreger bekannt und verursacht als primäres oder sekundäres Agens weltweit zahlreiche, ökonomisch relevante Erkrankungen bei einer Vielzahl von Haus- und Wildtieren (Abb. 7). Die vielgestaltigen *P. multocida*-Infektionen umfassen z. B. chronisch verlaufende Erkrankungen des Respirationstraktes (Bronchopneumonien bei Wiederkäuern und Schweinen), akute Septikämien (Wild- und Rinderseuche) oder osteolytisch deformierende Entzündungsprozesse in den Nasenhöhlen von Schweinen (*Rhinitis atrophicans*) (Allan *et al.*, 1985; Rimler & Rhoads 1989; Donnio *et al.*, 1994; Oros *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich meistens um aerogene Infektionen mit direkter Übertragung von Tier zu Tier, was auf eine besondere Affinität von *P. multocida* zu respiratorischen Organen hinweist (Rolle & Mayer, 2002).

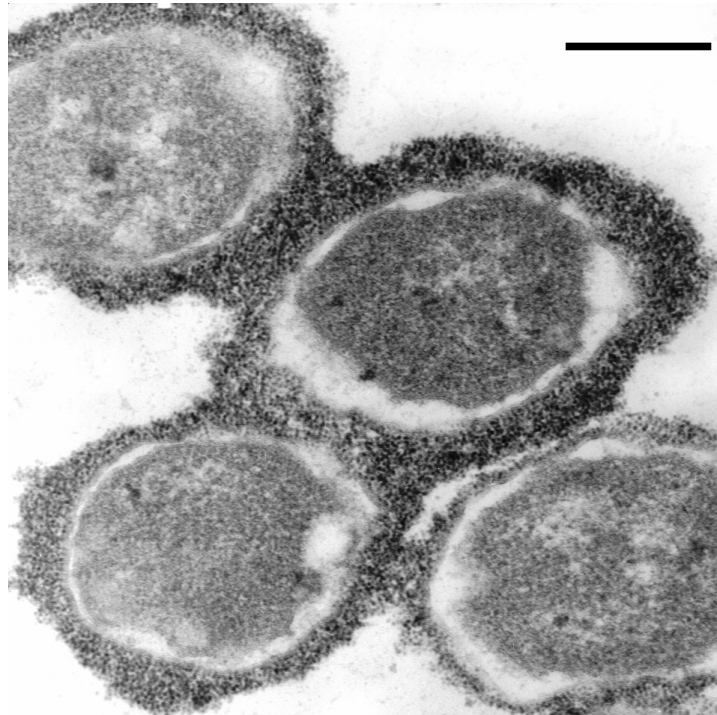


Abb. 7. Transmission elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pasteurella multocida* L386. Maßstabballen: 200 nm.

P. multocida wird serologisch auf der Basis von Kapsel (K)- und somatischen (O) Antigenen (AG) typisiert, wobei den Kapseltypen nach Carter die größte diagnostische Bedeutung zukommt (Selbitz, 1992). Die Einteilung in Serotypen basiert primär auf der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide und wurde mittels einer indirekten Hämagglutination (IHA) von Carter (1955) in 4 Kapseltypen A, B, D und E vorgenommen. Die Serotypen A und D werden vorrangig in deutschen Beständen bei den an EBP erkrankten Tieren nachgewiesen (Schimmel, 1987; Marschang *et al.*, 1998), während im anglo-amerikanischen Raum hauptsächlich *P. multocida*-Kapseltyp A (meist A3) gefunden wird (Frank, 1989; Confer *et al.*, 1996). Die durch den Kapseltyp E verursachten Allgemeininfektionen im Respirationstrakt bei Rindern treten nur noch sporadisch auf (Selbitz, 1992; Confer, 1993).

Seit der ersten Isolierung von *P. multocida* als Infektionserreger im Jahre 1881 wurde eine Vielzahl der Virulenz-assoziierten Faktoren beschrieben (Harper *et al.*, 2006). Die genauen Wirkmechanismen dieser verschiedenen Virulenzfaktoren sind bis heute aber noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Im Jahre 2001 wurde die Genom-Sequenzierung eines Geflügelcholera-Isolates, *P. multocida* (Stamm Pm70), abgeschlossen (May *et al.*, 2001). Acht Prozent des 2,26 Mega-Basenpaaren großen Genoms kodieren für ca. 165

putative Virulenz-assoziierte Gene, deren Identifizierung neue Möglichkeiten zur Erforschung der molekularen Pathogenese von *P. multocida* hervorgerufenen Infektionen darstellt. Auf die wichtigsten der bis heute bekannten Virulenzfaktoren wird im Folgenden detaillierter eingegangen:

Die Bedeutung von zwei wichtigen toxischen Komponenten wurde hinreichend detailliert beschrieben. Dabei wird das Dermonekrotoxin (ToxA) als entscheidender Virulenzfaktor bei der Ätiologie und Pathogenese der Atemwegserkrankungen in Rinder- und Schweinebeständen angesehen (Schimmel *et al.*, 1992; 1994), und für mitogene und immunsuppressive Vorgänge verantwortlich gemacht (Foged, 1992). Das LPS-Endotoxin wird stetig von der Bakterienoberfläche freigesetzt und bewirkt die Entstehung der entzündlichen Reaktionen durch die Aktivierung von Leukozyten und Makrophagen (Rietschel *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1996).

Ebenso wie bei *M. haemolytica* gehört auch die Polysaccharid-Kapsel von *P. multocida* zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren. Sie übt außerhalb des Wirtsorganismus und im Zuge des Infektionsprozesses vielfältige Funktionen aus (Roberts, 1996; Boyce *et al.*, 2000a; Taylor & Roberts, 2005). Neben ihren Schutzfunktionen z. B. vor der Phagozytose oder der Lyse durch Serumfaktoren, trägt die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide der einzelnen Serotypen zur Wirtsspezifität und zu Unterschieden in der Virulenz einzelner Stämme bei (Corbeil & Gogolewski, 1985; Chung *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2004b; Boyce & Adler, 2006). Die Wichtigkeit der Kapsel bei der Infektion konnte durch die Virulenzabschwächung (Attenuierung) einer kapsellosen Mutante von *P. multocida* in Maus und Huhn bewiesen werden (Chung *et al.*, 2001).

Wie für alle bakterielle Erreger ist Eisen essentiell für die Etablierung und Proliferation von *P. multocida*. Um die kontinuierliche Eisenzufuhr sicherzustellen, besitzt *P. multocida* ca. 50 Gene, die für die Eisenaufnahmeproteine kodieren (May *et al.*, 2001). Darunter sind unter anderem das Siderophore Multicidin, der ExbB-ExbD-TonB-Locus, sowie Transferrin- und Hämoglobinbindende Proteine (Hu *et al.*, 1986; Ogunnariwo & Schryvers, 2001; Bosch *et al.*, 2002a; 2002b; Cox *et al.*, 2003).

Eine maßgebliche Rolle bei der Infektion wird außerdem noch den Fimbrien und äußeren Membranproteinen (z. B. OmpH, P6-like-Protein), den Lipoproteinen und einigen Enzymen (z. B. Neuraminidase, Superoxid-Dismutase) zugeschrieben (Harper *et al.*, 2006).

Der aktuelle Kenntnisstand über die Virulenzmechanismen von *P. multocida* weist Wissenslücken auf. Immer noch fehlt die Identifizierung der Virulenzfaktoren, die für die Invasion der Bakterien in die Wirtszellen oder für das Überleben in nährstoffarmer Umgebung erforderlich sind (Harper *et al.*, 2006). Weitere Forschungsarbeiten in diesem Feld sind für das bessere Verständnis der Pathogenese von *P. multocida* verursachten Erkrankungen notwendig.

1.3 Neue Perspektiven in der antibakteriellen Forschung

Die zunehmende Antibiotikaresistenz von Krankheitserregern wirft immer größere Probleme bei der Therapie von Infektionskrankheiten auf und stellt somit eine große Herausforderung für die Pharmaforschung dar (Schwarz & Kehrenberg, 2006). Forschergruppen arbeiten daher intensiv an der Entwicklung neuer Antibiotika nach strengen Auswahlkriterien. Die neuen Medikamente sollten nicht nur hochwirksam und kostengünstig sein, sondern auch ein geringes Potential zur Entstehung von neuen Resistenzen bei den Erregern besitzen und zusätzlich möglichst einen neuen Wirkmechanismus haben. D. h. die Substanz sollte einen bestimmten Stoffwechselvorgang in den Bakterien hemmen, der für diese lebensnotwendig ist und durch bekannte Antibiotika noch nicht tangiert wird. Diese Inhibierung erfolgt in der Regel durch eine Interaktion des Wirkstoffs mit einem Zielprotein (*drug target*), das bei diesem Stoffwechselvorgang eine essentielle Rolle spielt (Selzer *et al.*, 2004).

In der antibakteriellen Forschung werden neue aktive Substanzen zunächst auf ihre Wirkmechanismen untersucht. Die Kenntnis der Wirkmechanismen bereits charakterisierter Antibiotika lässt die Anwendung von modernen technischen und strategischen Möglichkeiten zur Identifizierung und Entwicklung neuer effizienterer Substanzen zu:

Zum einen kann eine gezielte Suche nach Leitstrukturen nach dem *target based approach* (Medikamentenentwicklung am Zielprotein) durchgeführt werden (Selzer *et al.*, 2000; Selzer *et al.*, 2004). Dabei kann die Identifikation spezifischer chemischer Substanzen gegen diese Zielproteine über zwei Wege erfolgen. Erstens können die potentiellen Wirkstoffe mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden anhand der Strukturmodelle des Zielproteins *in silico* gefiltert (*virtual Screening*) und anschließend *in vitro* auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Zweitens können Wirkstoff-Bibliotheken direkt am Zielprotein am *in vitro* Model (z.B. Zellkultur) getestet werden. Zum anderen kann eine Vorhersage über das Potenzial zur Kreuzresistenzentwicklung dieser

neuen Substanzen aufgrund der Zugehörigkeit zu Wirkstoffklassen getroffen werden (Werckenthin *et al.*, 2005). Die Kreuzresistenzen sind innerhalb einer Wirkstoffklasse häufig, zwischen verschiedenen Wirkstoffklassen eher selten. Zur Verringerung von Kreuzresistenzen ist die Identifikation neuer Wirkstoffklassen notwendig. So kann die Entwicklung von Substanzen aus diesen neuen Wirkstoffklassen selektiv favorisiert und beschleunigt werden.

1.3.1 Einsatz der *microarrays* in der antibakterieller Forschung

Um die Wirkmechanismen von Wirkstoffen aufzuklären und zu erforschen, wurden in den letzten Jahrzehnten Genomanalysen und Expressionsanalysen mit Hilfe von *microarrays* (Abb. 8) erfolgreich durchgeführt (Wilson *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 2000; Gmünder *et al.*, 2001; Freiberg *et al.*, 2004). Die *microarrays* sind cDNA- oder oligonukleotid-basierte Plattformen (*chips*), auf denen jeder *open reading frame* (ORF) des jeweiligen Genoms durch kurze Nukleotidsequenzen repräsentiert ist. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von Nukleinsäuren, zu hybridisieren. Sie bietet die Möglichkeit, durch ein einzelnes Experiment eine globale Übersicht von Genom-weiten Veränderungen der Genexpression zu bekommen (Abb. 9). Aus den jeweiligen Zellen wird dazu die mRNA isoliert und zur cDNA Synthese eingesetzt. Nach der Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff wird die cDNA mit einem *microarray* hybridisiert. Durch das Auslesen der *microarrays* können dann Expressionsveränderungen nachgewiesen werden, wie beispielsweise die Veränderungen, die durch Exposition der Bakterien mit einem Antibiotikum hervorgerufen werden (Lockhart & Winzeler, 2000). Das ist derzeit eine der wichtigsten Anwendungen von *microarrays* in der Pharmaforschung. Beispielsweise wurden die Expressionsprofile von *Haemophilus influenzae* und *Bacillus subtilis* in Gegenwart von Antibiotika, die unterschiedliche Stoffwechselforgänge in den Bakterien hemmen, dargestellt (Hughes *et al.*, 2000; Gmünder *et al.*, 2001).

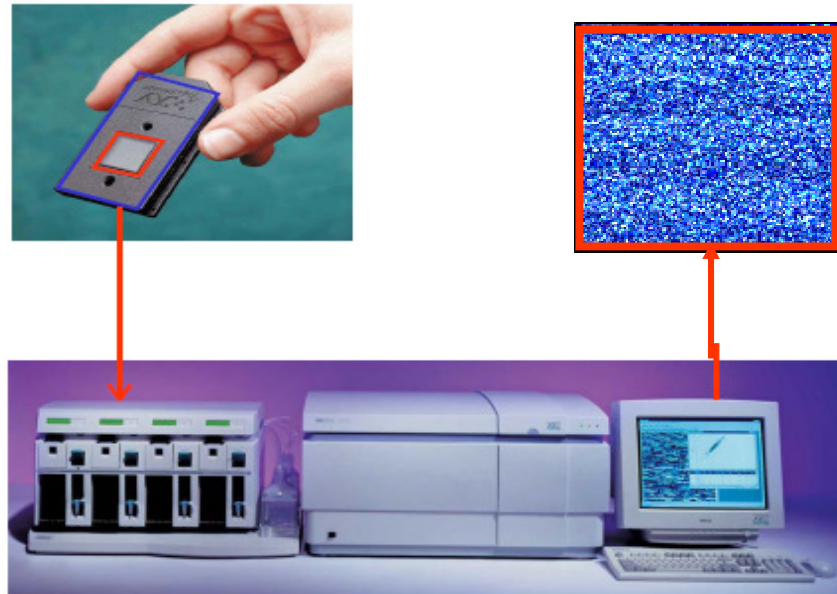


Abb. 8. Affymetrix *microarray* System. *Microarray* (links oben), die Waschstation mit dem Scanner (unten links und Mitte) und PC, *microarray* bild nach dem Auslesen mit Scanner (rechts oben).

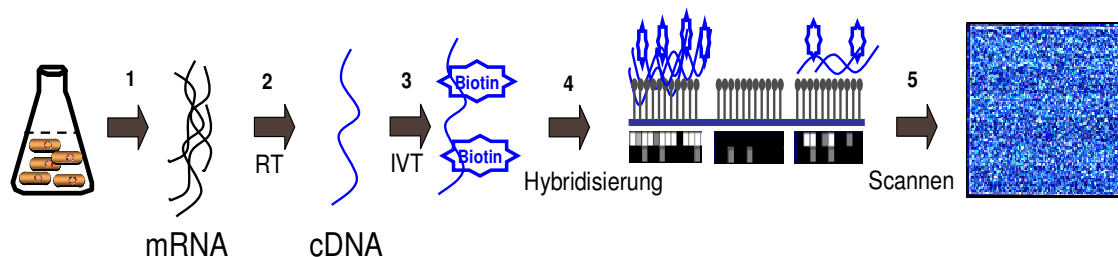


Abb. 9. Prinzip der Oligonukleotid-*microarrays*. Nach der Isolierung aus den Zellen (Schritt 1) wird die mRNA mittels reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben (Schritt 2) und anschließend mittels *in vitro* transcription (IVT) mit Biotin markiert (Schritt 3). Die markierte cDNA hybridisiert mit dem Oligonukleotid-*microarray* (Schritt 4) und die Fluoreszenzintensitäten werden für jedes Oligo (11 Oligo's pro Gen) gemessen (Schritt 5).

1.3.2 Referenzkompendium

Diese Forschungsarbeiten haben bewiesen, dass in Gegenwart von Inhibitoren die Expressionsprofile von Mikroorganismen die spezifische transkriptionelle Antwort der Zelle auf die Hemmung einer bestimmten zellulären Funktion widerspiegeln. Dementsprechend geben diese charakteristischen Expressionssignaturen einen Aufschluss über den Wirkmechanismus (*mode of action*, MoA) des Inhibitors (Brazas & Hancock 2005). Eine Zusammenfassung der Expressionsprofile und der charakteristischen Signaturen von mehreren verschiedenen Antibiotika unterschiedlicher Wirkung ergibt ein Referenz-

renzkompodium (Freiberg *et al.*, 2004). Anschließend wird das Referenzkompodium für die Aufklärung des Wirkmechanismus' neuer potentieller Antibiotika genutzt. So können durch den Gebrauch geeigneter Algorithmen zur Mustererkennung Substanzen anhand der charakteristischen Expressionsprofile globalen Wirkortfeldern (z. B. Folatbiosynthese) zugeordnet werden (Abb. 10) (Yeang *et al.*, 2001; Freiberg *et al.*, 2004).

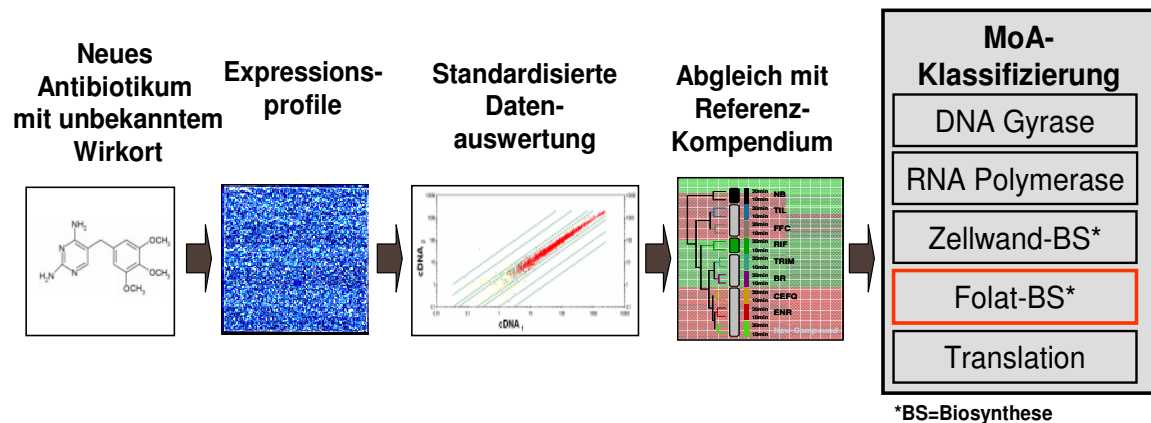


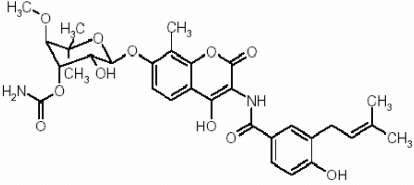
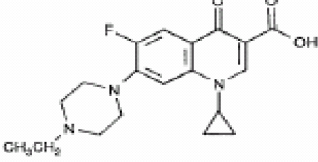
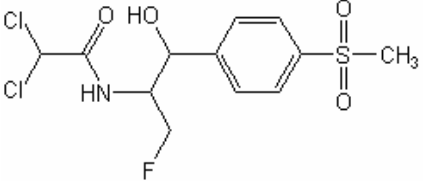
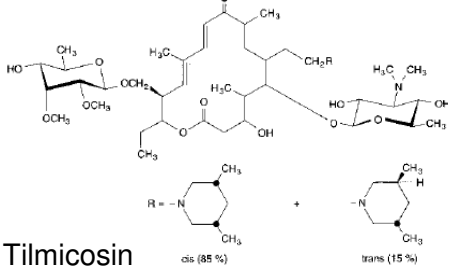
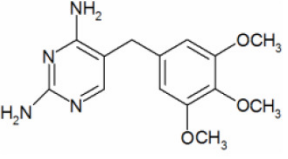
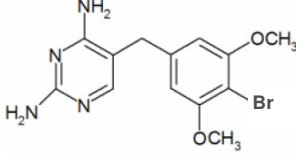
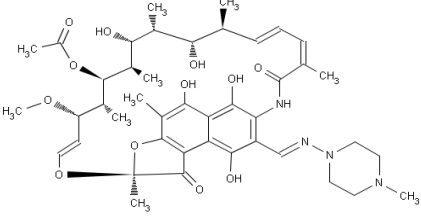
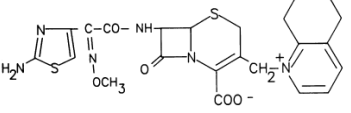
Abb. 10. Schematische Darstellung der Klassifizierung von Wirkmechanismen antibakterieller Substanzen auf der Basis von Expressionsprofilen aus dem Referenzkompodium. Für die standardisierte Vorgehensweise von der Datenerhebung über die Datenauswertung bis hin zur Zuordnung des Wirkmechanismus' stehen Softwareprogramme zur Verfügung (Abbildungen aus MAS 5.0 und VectorXpression).

Die vorhandenen Genomsequenzen von *M. haemolytica* und *P. multocida* ermöglichen die Nutzung der *microarray*-Technik zum Erstellen eines Referenzkompodiums, welches die wichtigsten bekannten Wirkstoffklassen abdeckt (May *et al.*, 2001; Gioia *et al.*, 2006). Zu diesen Wirkstoffklassen gehören:

- DNA Topoisomerase-Inhibitoren,
- RNA-Polymerase Inhibitoren,
- Translationsinhibitoren,
- Inhibitoren der Folatbiosynthese und
- Inhibitoren der Zellwandbiosynthese.

Im Folgenden wird ausführlich auf die Antibiotika eingegangen, die in der vorliegenden Arbeit zum Erstellen des Referenzkompodiums verwendet wurden (Tab. 3). Diese lassen sich den aufgeführten Wirkstoffklassen zuordnen.

Tabelle 3. Antibiotika des Referenzkompendiums. (*BS-Biosynthese).

Wirkstoffklassen	Antibiotika / Strukturformel	
DNA Gyrase-Inhibitoren	 <p>Novobiocin</p>	 <p>Enrofloxacin</p>
	 <p>Florfenicol</p>	 <p>Tilmicosin</p>
Proteinsynthese-Inhibitoren	 <p>Trimethoprim</p>	 <p>Brodimoprim</p>
Folat-BS*-Inhibitoren	 <p>Rifampicin</p>	
RNA-Polymerase Inhibitor	 <p>Cefquinom</p>	
Zellwand-BS* Inhibitor		

1.3.3 Substanzen des Referenzkompendiums

Novobiocin und Enrofloxacin sind DNA Gyrase-Inhibitoren (Prescott, 1998). Die DNA Gyrase ist eine Topoisomerase II, welche aus zwei alpha- und zwei beta- Untereinheiten besteht und die negative DNA Überspiralisierung (*supercoiling*) bei Bakterien vermittelt (Reece & Maxwell, 1991; Roca, 1995; Berger & Wang, 1996).

Das Fluorochinolone Enrofloxacin (ENR) wird seit 1988 ausschließlich in der Veterinärmedizin zur Behandlung von bakteriellen Erkrankungen des Atmungs- und Verdauungstraktes eingesetzt (Prescott, 1998). Es wirkt bakterizid gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien und besitzt die niedrigsten minimalen Hemmkonzentrationswerte (MHK-Werte) unter den Antibiotika (Mengozi *et al.*, 1996; Walker, 2000).

Novobiocin ist ein bakteriostatisch wirkendes Cumarin, welches im humanen und veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt wird und vorwiegend gegen Gram-positive Keime wirksam ist (Thornsberry *et al.*, 1997; Prescott, 1998). Novobiocin wurde für *microarray*-basierte Expressionsanalysen bei *H. influenzae* und *B. subtilis* eingesetzt (Gmuender *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2006). Aufgrund von Nebenwirkungen und Verträglichkeitsproblemen wurde Novobiocin jedoch hauptsächlich als Reserve-Antibiotikum eingesetzt (Gräfe, 1992). Allerdings ist das Interesse an Novobiocin in den letzten Jahren wieder gestiegen. Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass es *in vitro* Aktivität gegen multiresistente Erreger, darunter auch Vancomycin-resistente Erreger, wie z. B. Staphylokokken besitzt (Walsh *et al.*, 1985; Proctor *et al.*, 1987).

Tilmicosin (halbsynthetisches Makrolid) und Florfenicol (fluoriertes Chloramphenicol-Derivate) sind Translationsinhibitoren. Sie hemmen die Proteinsynthese der Mikroorganismen durch die Blockierung der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (Prescott, 1998). Beide Antibiotika wirken bakteriostatisch gegen Gram-positive und Gram-negative Erreger und werden weit verbreitet in der Veterinärmedizin eingesetzt (Varma *et al.*, 1986; Prescott, 1998). Der direkte Vergleich zeigt, dass Florfenicol eine bessere Wirksamkeit besitzt (Hoar *et al.*, 1998).

Trimethoprim und Brodimoprim sind gegen Gram-negative und Gram-positive Keime bakteriostatisch wirkende Diaminobenzylpyrimidine. Sie werden sowohl in der Humanmedizin als auch im veterinärmedizinischen Bereich

eingesetzt (Braunsteiner & Finsinger, 1993; Prescott, 1998). Beide Substanzen hemmen die Dihydrofolat-Reduktase, welche Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure reduziert. Sie verursachen dadurch einen Mangel an Tetrahydrofolsäure, was zu einer deutlich verminderten Purin- und Thymidinsynthese führt (Then & Hermann, 1984; Amyes, 1993; Quinlivan *et al.*, 2000). Dieser Effekt spiegelte sich auch in den Expressionsprofilen von Trimethoprim in *B. subtilis* wider, wie bereits von Hutter *et al.* (2004) und Freiberg *et al.* (2006) gezeigt wurde.

Zusätzlich haben Freiberg *et al.* (2006) Rifampicin als eine der Referenzsubstanzen für das Referenzkompendium von *B. subtilis* eingesetzt. Rifampicin ist ein halbsynthetisches Antibiotikum der Gruppe der Ansamycine (Rifamycine). Es wird vorwiegend bei Infektionen mit Mykobakterien, insbesondere bei Tuberkulose und Lepra, eingesetzt (Furesz, 1970). Der Wirkmechanismus von Rifampicin besteht in der Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche aus 4 Untereinheiten ($\alpha\beta\beta'\omega$) besteht und die RNA-Synthese katalysiert (Floss & Yu, 2005; Mandell, 1983). Eine Induktion der RNA-Polymerase-Expression wurde mittels der *microarray*-basierenden Expressionsanalysen bei *E. coli* durch die Inkubation mit Rifampicin gezeigt (Shaw *et al.*, 2003).

Das in dieser Arbeit verwendete Cefquinom gehört zu den Cephalosporinen der vierten Generation mit bakterizider Wirkung vor allem gegen Gram-negative Bakterien (Chin *et al.*, 1992; Hornish & Kotarski, 2002). Cephalosporine sind Beta-Lactam-Antibiotika, die den Zellwandaufbau der Bakterien durch die irreversible Blockierung der Transpeptidase hemmen (Hornish & Kotarski, 2002; Baggot *et al.*, 2007). Die Transpeptidase ist eine im Periplasma lokalisierte Serin-Hydrolase, welche die Verlinkung der Peptidoglykane während der Zellwandsynthese katalysiert (Bush & Mobashery, 1998). Cefquinom ist extra für die Veterinärmedizin entwickelt worden und besitzt neben einem breiten Wirkungsspektrum und einer hohen Wirkintensität auch eine ausgeprägte β -Laktamase-Stabilität (Limbert *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1994).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Auf dem Tiergesundheits-Markt werden mehrere Präparate gegen Infektionskrankheiten, auch gegen die enzootische Bronchopneumonie angeboten. Dennoch konnte die Verbreitung der Erkrankungen sowie die Häufigkeit des Vorkommens nicht eingedämmt werden. Durch die Intensivbehandlung und unnötiges Einsetzen von Antibiotika entstanden viele resistente Stämme,

auch von *M. haemolytica* und *P. multocida*. Weitere Resistenzentwicklungen werden erwartet, die auch zukünftig zur vermehrten Erfolgslosigkeit der antibiotischen Therapie führen werden. Um diesem Prozess entgegenwirken zu können, werden neue Medikamente benötigt. Im Idealfall sollten die neuen Antibiotika ein geringes Potential zur Entstehung von neuen Resistenzen bei den Erregern besitzen und zusätzlich einen neuen Wirkmechanismus haben. Die Identifizierung und Erforschung des Wirkmechanismus' von neuen antibiotisch wirksamen Substanzen ist ein entscheidender Faktor in der antibakteriellen Forschung.

Zu diesem Zweck war es in der vorliegenden Arbeit geplant, ein Referenz-Datensatz aus den Expressionsprofilen von *M. haemolytica* und *P. multocida* nach der Exposition mit acht verschiedenen Antibiotika (Referenzkompendium) zusammenzustellen. In Gegenwart von Antibiotika verändern die Mikroorganismen spezifisch die Transkription von Genen. Diese transkriptionelle Antwort (Expressionsprofil) von *M. haemolytica* und *P. multocida* sollte mittels *microarrays* detektiert werden. Jedes Expressionsprofil besitzt eine charakteristische Signatur, die auch *fingerprint* genannt wird. Dabei hat jede Wirkstoffklasse ihre eigene Signatur. Außerdem war die Identifizierung der Signaturgene und der Regulation von Stressfaktoren geplant. Als zusätzlicher Aspekt bei der Datenanalyse sollten die Expressionsprofile von *M. haemolytica* und *P. multocida* nach der Behandlung mit gleichen Antibiotika miteinander verglichen werden. Es war vorgesehen, das erstellte Referenzkompendium zur Charakterisierung und Klassifizierung zweier neuer Substanzen (ein Molekül der Gruppe Thiazine und ein synthetisches halogeniertes Furanon C-30) mit bislang unbekanntem Wirkort zu verwenden. Die Expressionsprofile von *M. haemolytica* und *P. multocida* nach der Inkubation mit diesen Substanzen ergaben einen *fingerprint*. Der Vergleich dieser Expressionsprofile mit dem Referenzkompendium sollte zu einem Vorschlag für die vermutete Wirkmechanismen führen. Von besonderer Bedeutung bei der Datenanalyse war die Identifizierung der Auswirkung von Antibiotika auf die Expression von Virulenzfaktoren, die durch *M. haemolytica* und *P. multocida* synthetisiert werden und essentiell für das Auslösen der enzootischen Bronchopneumonie sind. Anschließend war eine phenotypische Charakterisierung der mit Antibiotika behandelten Erreger vorgesehen. Diese Analyse sollte Hinweise über die Auswirkung der Antibiotika auf die Virulenz dieser Pathogene geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, USA
Capacitance Extender Plus	Bio-Rad, Deutschland
DU 640 Spektrometer	Beckman Coulter, Inc. USA
EM10	Zeiss, Deutschland
Gen Chip Hybridization Ofen 640	Affymetrix, USA
Gene Array Scanner	Agilent, USA
Gene Chip Fluidics Station 400	Affymetrix, USA
GenePix Personal 4100A	Axon, USA
Gene Pulser II	Bio-Rad, Deutschland
Genesys 20 Spectrophotometer Modell 4001/4	Thermo Spectronic, USA
IDA (Image Documentation & Analysis)	Raytest, USA
Pulse Controller Plus	Bio-Rad, Deutschland
Savant SpeedVac plus	GMI, USA

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Enzymsets, Primer

Die verwendeten Chemikalien waren, soweit erhältlich, analyserein. Nicht ausgeführte Chemikalien, Enzyme, Enzymsets und *primer* wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen und verwendet.

10 x TBE	AppliChem GmbH, Deutschland
20 x SSPE	Cambrex Bio Science Rockland, USA
Absolute SYBR Green ROX Mix	Applied Biosystems, USA
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Biorad, USA
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Deutschland
Anti-Streptavidin antibody (goat), biotinylated	Vector Laboratories, CA USA

Aquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
Bioarray Terminal Labeling Kit	Enzo Life Sciences, Inc. NY USA
BioPrime Labelling Kit(18094-011)	Invitrogen, USA
Bouillon Cerveau-Coeur (BHI)	AES Laboratory, Frankreich
Brodimoprim	Intervet Innovation GmbH, Deutschland
BSA	Invitrogen, USA
Cefquinom	Intervet Innovation GmbH, Deutschland
Cryobank	Mast Diagnostica, Deutschland
dNTPs	Promega, USA
DPBS	Cambrex Bio Science Rockland, USA
Epon 128	Plano GmbH, Deutschland
Epon- Beschleuniger DMP- 30	Plano GmbH, Deutschland
Epon- Härter DDSA	Plano GmbH, Deutschland
Epon- Härter MNA	Plano GmbH, Deutschland
Formamid deionisiert	Piedel-de Haen, USA
FPLCpure Dnase I	Amersham Biosciences, USA
Gel-Extraktion-Kit	Qiagen, Hilden
Genomic DNA Kit	Qiagen, Hilden
Immunopure Steptavidin	Pierce, USA
Mueller Hinton Bouillon	OXOID, Basingstoke, England
Mueller Hinton II Agar	OXOID, Basingstoke, England
NeutrAvidin	Pierce, USA
Oligonukleotide (primer)	MWG Biotech AG, Deutschland
Osmiumtetroxid	Plano GmbH, Deutschland
PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
pCRTopo Vektor	MWG Biotech AG, Deutschland
Pellet Paint Co-Precipitant	Novagen, Darmstadt, Deutschland
Plasmid-Mini/Midi/Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden

MATERIAL & METHODEN

Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, USA
polyd-A	MWG Biotech AG, Deutschland
PPLO Agar	Becton Dickinson DIFCO, USA
Restriktionsendonukleasen	Roche, Deutschland
Rneasy Midi Kit	Qiagen, Deutschland
Schaffsblut	OXOID, Basingstoke, England
SDS	Biorad, USA
SSC	Gibco, USA
Streptavidin Phycoerythrin SAPE	Pierce, USA
SuperScript Kit, First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, USA
SYBR Gold	Molecular Probes, USA
T-4 DNA Ligase	New England BioLabs, USA
Thiazin	Intervet Innovation GmbH, Deutschland
TOPO TA-Cloning Kit	Invitrogen, USA
Trimethoprim	Intervet Innovation GmbH, Deutschland
Tris HCl	AppliChem GmbH, Deutschland
yeast tRNA	MWG Biotech AG, Deutschland
Kupfernetzchen 200mesh	Plano GmbH, Deutschland

2.1.3 Puffer, Lösungen

TE Puffer; pH 8,0:

Tris HCl	10,0	mM
EDTA	1,0	mM

Lysozym Stammlösung:

50 mg/ml in RNase freiem H₂O

Streptomycin Stammlösung:

100 µg/ml in H₂O, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C mehrere Monate haltbar.

Hämoglobin bovine Stammlösung:

25mg/ml Hämoglobin bovine in PBS (steril) immer frisch angesetzt.

holo-Transferrin bovine Stammlösung:

50mg/ml holo-Transferrin bovine in PBS (steril) immer frisch angesetzt.

Eisenchlorid Stammlösung:

10mM Eisenchlorid in H₂O bidest (steril) immer frisch angesetzt.

Novobiocin Stammlösung:

6,4 mg/ml in H₂O, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Enrofloxacin Stammlösung:

0,64 mg/ml in H₂O, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Florfenicol Stammlösung:

0,04 mg/ml in H₂O, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Cefquinom Stammlösung:

0,0252 mg/ml in H₂O, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Tilmicosin Stammlösung:

160 mg/ml in 0,1 M Phosphate Puffer pH 7,2, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Trimethoprim Stammlösung:

0,2 mg/ml in 0,3 % DMSO, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Brodinoprim Stammlösung:

10 mg/ml in 25 % DMSO, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Rifampicin Stammlösung:

0,2 mg/ml in 0,25 % DMSO, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Tihazin Stammlösung:

0,1 mg/ml in 2 % DMSO, immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Färbelösung "Stain-all":

Stains-all	0,2 mg/ml
Essigsäure	0,06 %
Formamide	50 %

1,0% Agarose Gel:

Agarose	1,0 g
1x TBE; pH 8,3	100,0 ml

MATERIAL & METHODEN

Formaldehyd-Agarose Gel:

Agarose	1,2	g
10x FA Gel Puffer; pH 7,0	10,0	ml
RNase freies H ₂ O	90,0	ml

Die Lösung wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung auf 65°C abgekühlt und 1,8 ml 37% wässrige Formaldehydlösung (12,3 M) zugegeben.

10 x FA Gel Puffer; pH 7,0:

EDTA	10,0	mM
MOPS(3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure Na-Salz	200,0	mM
Na-acetat	50,0	mM

RNA Dye:

0,25% Bromphenolblau	2,5	mg
1 mM EDTA; pH 8,0	100,0	µl
50% Glycerin	500,0	µl
0,25% Xylencyanol	2,5	mg
Loading Buffer; pH 7,6	400,0	µl

Loading Buffer; pH 7,6:

Formaldehyd	150,0	µl
Formamid	500,0	µl
10 x MOPS	100,0	µl

6% Polyacrylamidgel:

Acrylamid/Bisacrylamid	2,0	ml
10 x TBE; pH 8,3	500,0	µl
10% APS	200,0	µl
TEMED	8,0	µl
H ₂ O	7,4	ml

5 x Probenpuffer; pH 8,3:

Glycerin	50,0	%
EDTA	0,01	M
Bromphenolblau	0,25	%
Xylencyanol	0,25	%
Tris Borat	0,44	mM

10x dNTP mix cDNA:

dATP	2,0	mM
dCTP	0,5	mM
dGTP	2,0	mM
dTTP	2,0	mM

Stop solution für DNA Markierung:

Na ₂ EDTA; pH 8,0	0,5	M
------------------------------	-----	---

Hybridisierungspuffer Affymetrix Array

2xMES Hybridization Buffer; pH 6,5:

MES; pH 6,5	100,0	mM
NaCl	1,0	M
Tween-20	0,01	%
EDTA	20,0	mM
<i>Molecular Biology Grade Water</i>	-	

Washing buffer A; pH 7,4:

SSPE; pH 7,4:	6,0	x
Tween-20	0,01	%

Washing buffer B; pH 6,5:

MES; pH 6,5	100,0	mM
NaCl	0,01	M
Tween-20	0,01	%

2xMES Staining Buffer; pH 6,5:

MES; pH 6,5	200,0	mM
NaCl	2,0	M
Tween-20	0,1	%

Streptavidin Solution Mix

2x MES <i>Staining Buffer</i> ; pH 6,5	1,0	x
<i>acetylated BSA</i>	2,0	mg/ml
Streptavidin	10,0	µg/ml
<i>Molecular Biology Grade Water</i>	-	

Antibody Solution

2x MES <i>Staining Buffer</i> ; pH 6,5	1,0	x
<i>acetylated BSA</i>	2,0	mg/ml
Goat IgG	0,1	mg/ml
<i>Anti Streptavidin antibody biotinylated</i>	5,0	µg/ml
<i>Molecular Biology Grade Water</i>	-	

SAPE Solution

2x MES <i>Staining Buffer</i> ; pH 6,5	1,0	x
<i>acetylated BSA</i>	2,0	mg/ml
Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)	10,0	µg/ml
<i>Molecular Biology Grade Water</i>	-	

Elektronenmikroskopie

EM- Puffer, pH 7,4

Natriumcacodylat × 3 H ₂ O	0,1	M
Saccharose	0,12	M

Glutaraldehydlösung

2% Glutaraldehyd in EM- Puffer

Osmiumtetroxidlösung

3 % OSO_4 in H_2O bzw.

1,5 % OSO_4 aus 3 % OSO_4 verdünnt 1:1 mit EM- Puffer, pH 7,4.

Uranylacetatlösung

0,5 % Uranylacetat frisch ansetzen und sterilfiltrieren. Bei RT dunkel aufbewahren.

Epon- Gemisch

Epon 128	8,00	g
DDSA	4,00	g
MNA	4,34	g
BDMA	0,18	g

20 min mischen und blasenfrei verwenden; jedes Mal frisch herstellen.

2.1.4 Zellkulturmedien

BHI-Medium; pH 7,4:

BHI Agar	37,0	g/l
----------	------	-----

Der Agar wurde in 1 l H_2O gelöst und 15 min bei 121 °C autoklaviert.

LB-Agar:

LB-Medium	1000	ml
Agar-Agar	15	g/l

Das Medium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Nachdem das Medium auf 50 °C abgekühlt war, wurde dieses in Plastikpetrischalen gegossen.

LB-Medium, pH 7,9:

Tryptone	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	5	g/l

Das Medium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert.

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme

Für die vorliegende Arbeit wurden *Mannheimia haemolytica* Stamm M7/2 (Rinderisolat, Intervet Innovation), *Pasteurella multocida* Stamm L386 (Rinderisolat, Intervet Innovation), *Escherichia (E.) coli* Stamm ATCC 25922 und Top10 (Invitrogen, USA) verwendet.

2.1.6 Herstellung des *Pasteurellaceae microarrays*

Die Herstellung des *Pasteurellaceae microarrays* (MPS-*microarray*) wurde von Affymetrix, USA, durchgeführt und beruht auf der photolithographischen Festphasen-Synthese (VLSIPS® *Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis*). Die Technologie ist im Detail in *Microarray Biochip Technology* (Sчена, 2000) beschrieben. Der MPS-*microarray* enthält Oligonukleotide zu den *open reading frames* (ORFs) von *M. haemolytica* (2695 ORFs), *P. multocida* (2042 ORFs) und *S. aureus* (2421 ORFs). Die Firma Affymetrix hat ein besonderes Verfahren entwickelt, speziesspezifische Regionen auf Genen zu entdecken und diese Regionen in Form von Oligonukleotiden auf proprietären Trägermaterialien zu synthetisieren. Dabei wurde jedes Gen durch 11 verschiedene Oligonukleotide mit jeweils 25 Basen Länge (*probe sets*) erfasst. Die speziesspezifischen Oligonukleotide ermöglichten simultane Hybridisierungen mit cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* durchzuführen. Die in Vorversuchen identifizierten kreuzhybridisierende Gene/ *probe sets* (*M. haemolytica*: 33, *P. multocida*: 36) wurden bei der späteren Daten-Analyse herausgefiltert (Tab. A3, A4 im Anhang).

2.1.7 Computerprogramme

Für die bioinformatische Auswertung wurden folgende Programme und Algorithmen benutzt:

IDA, Raytest, USA

Programm zum Dokumentieren von Gelbildern mit Hilfe von UV Licht

MAS 5.0, Affymetrix, USA

Programm zur Analyse der *microarray* Genexpression Experimenten

Metalife Trinity 2006 2.2 Metalife AG, Winden

Programm zur bioinformatischen Tiefenanalyse, BLAST-Suchen

Vector Xpression 3.0, Informax, USA

Programm zur Analyse der Genexpressionsdaten aus *microarray*-Experimenten

Vector NTI 9.0, Informax, USA

Programm zur Analyse der Sequenzen

Vector PathBlazer 2.0, Informax, USA

Programm zur Analyse der Stoffwechselwege und Genexpressionsdaten aus *microarrays* Experimenten

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Ermittlung der MHK erfolgte nach der Bouillon-Dilutionsmethode (Mikrodilution) entsprechend NCCLS M31-A2 (NCCLS, 2003). Ausgehend von einer 18 h Reinkultur des Erregers oder Kontrollkeimes (*E. coli* ATCC 25922) auf einem festen MHA Nährboden wurden mindestens 10 Kolonien in 4 ml des flüssigen Nährmediums MHB mit Zusatz von 5% Schaffsblut überimpft und bei 37 °C bebrütet, bis der gewünschte Trübungsstandard nach ~ 2 h erreicht oder übertroffen war. Das Inokulum wurde anschließend mit dem entsprechenden sterilen Nährmedium auf eine optische Dichte von McFarland 0,5 eingestellt. Die Überprüfung erfolgte photometrisch bei der Wellenlänge 578 nm. Der OD Wert lag zwischen 0,10 und 0,15 und entsprach einer Keimkonzentration von etwa 10^8 koloniebildende Einheiten / ml (KBE / ml). Das Inokulum wurde nach dem Einstellen noch einmal 1:100 im MHB verdünnt, um eine Keimkonzentration von etwa 10^6 KBE / ml zu erreichen. Innerhalb 15 min nach Standardisierung wurde das Inokulum auf die Prüfplatte (Tab. 4), eine sterile Mikrottestplatten mit 8×12 küvettenartigen Vertiefungen (Wells) mit einem Fassungsvermögen von jeweils $< 500 \mu\text{l}$, aufgebracht, wobei in jede Vertiefung $50 \mu\text{l}$ pipetiert wurden. Das entsprach der Keimkonzentration von 5×10^5 KBE / ml. Die inokulierte Prüfplatte wurde abgedeckt und über Nacht unter atmosphärischen Bedingungen bei 37 °C bebrütet.

Die Auswertung wurde gemäß SOP AI-13 (Intervet Innovation) durchgeführt. Die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein sichtbares Keimwachstum auftrat, wurde als minimale Hemmkonzentration bezeichnet. Das Kriterium für Wachstum war deutliche Trübung vom Testmedium. Bei der Beurteilung des Wachstums wurden die Wachstumscharakteristika der Bakterien in den Wachstumskontrollvertiefungen (Reihe 12) zu Grunde gelegt.

Tabelle 4. Belegung der Prüfplatten für die MHK-Bestimmung:

Antibiotikum	Konzentrationsbereich [$\mu\text{g/ml}$]
Novobiocin (NB)	128,0-0,125, und 1,0-0,001
Enrofloxacin (ENR)	1,0-0,001
Florfenicol (FFC)	32,0-0,032
Tilmicosin (TIL)	64,0-0,063
Cefquinom (CEF)	4,0-0,004
Rifampicin (RIF)	64,0-0,063, und 4,0-0,004
Trimethoprim (TRM)	64,0-0,063, und 4,0-0,004
Brodimoprim (BR)	16,0-0,016
Thiazin (TZ)	2,0-0,002

2.2.2 Kultivierung von *M. haemolytica* und *P. multocida*

Kolonien von höchstens 18 h alten BHI-Agar Platten mit *P. multocida* L386 und BHI-Agar (100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) mit *M. haemolytica* M7/2 wurden mit einer Impföse aufgenommen und in 1 ml BHI-Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension wurden die Flüssigkulturen auf eine OD_{578} von 0,05 eingestellt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 250 rpm für die angegebenen Zeiten mit unterschiedlichen Antibiotika inkubiert.

2.2.3 Wachstum in Gegenwart von Antibiotika

Zur Aufnahme eines kinetischen Expressionsprofils von *M. haemolytica* und *P. multocida* wurden die Bakterien nach der Inkubation mit der einfachen MHK nach 10 bzw. 30 min und mit der zehnfachen MHK nach 10 min geerntet. Als Kontrolle dienten in den Experimenten Bakterien, denen kein Antibiotikum zugesetzt wurde. Um ausreichend biologisch unabhängigen Daten für statistische Analysen zu erhalten, wurde jedes Experiment in jeweils drei unabhängigen Versuchen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Das Standardprotokoll zur Anzucht der Bakterien sah vor, dass alle Experimente eines Peplikas von der gleichen Stammkultur ausgehen und nach einem bestimmten standardisierten Protokoll kultiviert werden.

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass in der logarithmischen Wachstumsphase, bei einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,6, die Genexpression den geringsten Schwankungen unterliegt (Roehrig *et al.*, 2007). Deshalb wurde der Zeitpunkt der Antibiotika-Zugabe bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,25 und 0,35 gewählt, dabei lag der Endpunkt der Wachstumskurve immer im optimalen Bereich bei einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,6 (Abb. 11).

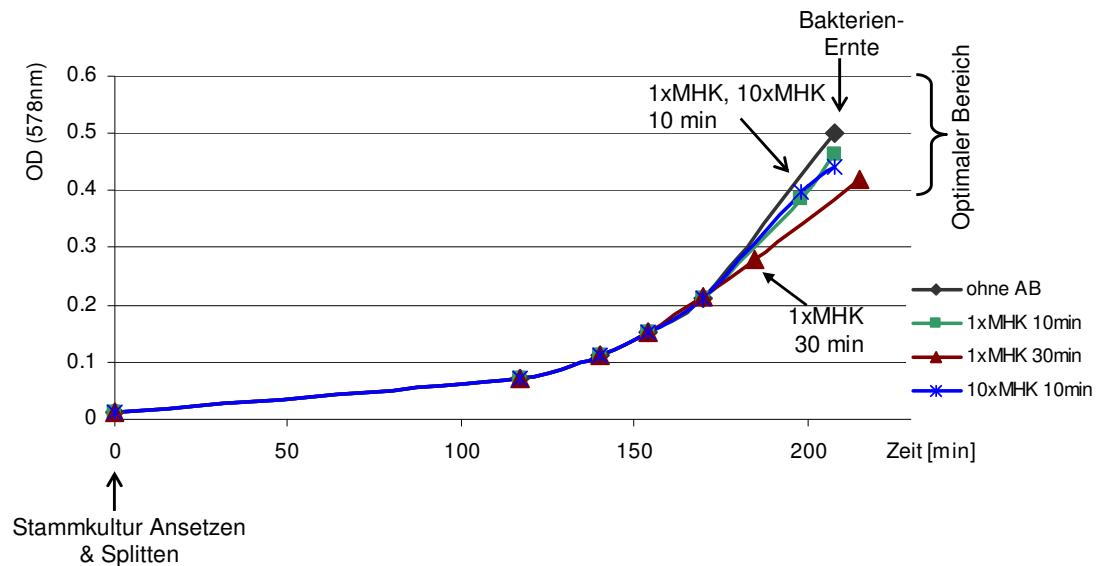


Abb. 11. Inkubation von *P. multocida* in Gegenwart von Novobiocin. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 10 bzw. 30 min die einfache MHK und für 10 min die zehnfache MHK von Novobiocin zugefügt (Pfeile). Die Graphen zeigen ein repräsentatives Experiment.

In einem weiteren Schritt des Standardprotokolls wurde die mRNA der Bakterien aus den jeweiligen Kulturen isoliert. In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, dass zwischen der separaten und der simultanen Hybridisierung der cDNA von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf dem *microarray* kein Unterschied vorhanden war. Der Anteil der kreuzhybridisierenden Gene, die während der Kontrollexperimente ermittelt wurde lag bei <1,7% (Tab. A3, A4 im Anhang). Dieser geringe Prozentsatz ermöglichte in allen weiteren Experimenten eine simultane Hybridisierung der cDNAs beider Organismen auf dem *microarray*. Das ermöglichte enorme Zeit- und Kostenersparnisse für die gesamte Arbeit. Weiterhin wurde in diesen Vorversuchen die optimale cDNA Menge (2,5 µg) bestimmt, die darauf hin bei allen Hybridisierungen zur Detektion der Expressionsprofile eingesetzt wurde. Für die cDNA Synthese durch die Reverse Transkriptase wurde die mRNA beider Bakterien 1:1 gemischt (Abb. 12). Die so erhaltene cDNA wurde mit Biotin markiert und anschließend mit den Oligonukleotiden des *microarrays* für 16 h hybridisiert. Danach wur-

den die *microarrays* gewaschen und die Fluoreszenzsignale im Laser ausgelesen.

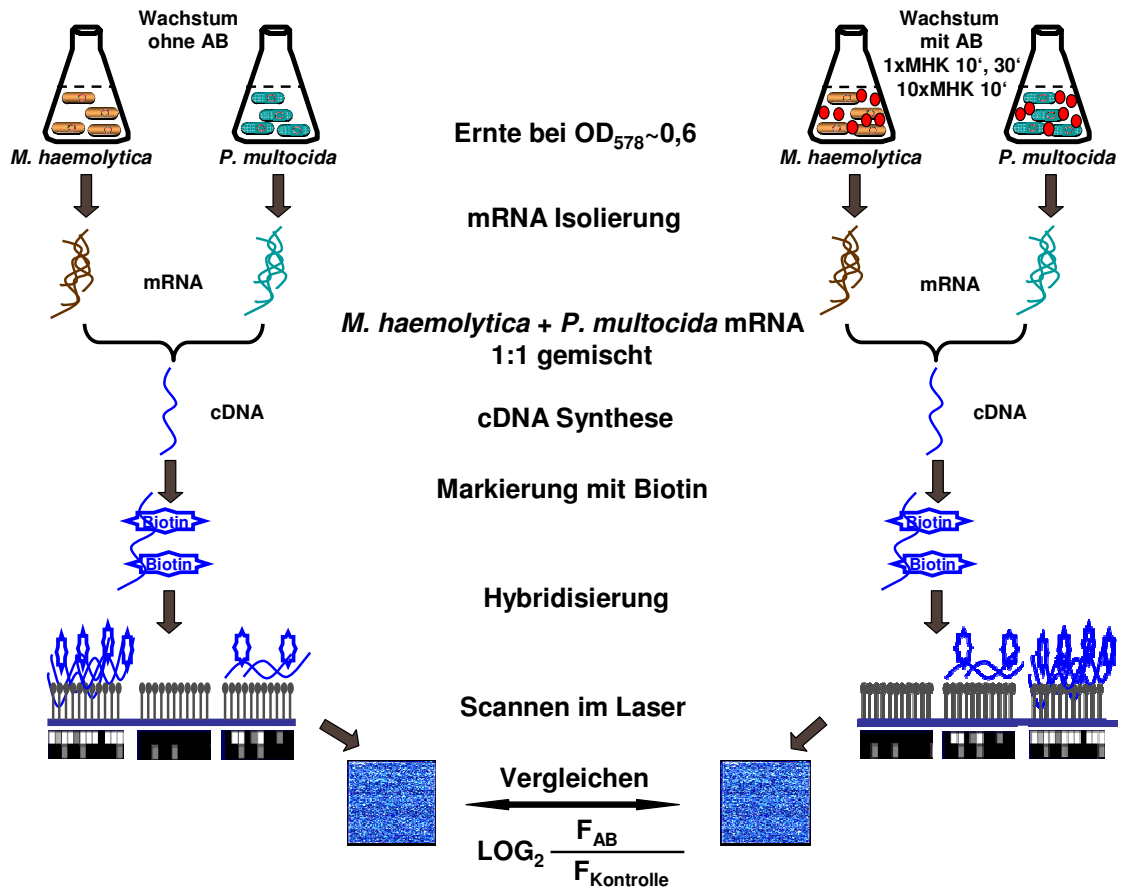


Abb. 12. Experimenteller Ansatz zum Vergleich von Expressionsprofilen mit und ohne Antibiotika. AB - Antibiotika (roter Punkt).

Diese Art der Durchführung minimierte die Varianzen zwischen verschiedenen Experimenten und gewährleistete, dass die Vergleichbarkeit zwischen allen Arrays gegeben war. Diese Tatsache war für eine spätere statistische Auswertung der Transkriptom-Daten von entscheidender Bedeutung.

2.2.4 RNA Isolierung von *M. haemolytica* und *P. multocida*

Die RNA aller Bakterien wurde aus 50 ml Bakterienkulturen isoliert. Dazu wurde das Standardprotokoll für den Rneasy® Midi Kit (Qiagen) befolgt (Han *et al.*, 1987). Die isolierte RNA wurde nach dem Standardprotokoll für *Pellet Paint Co-Precipitant* (Novagen) aufkonzentriert. Das RNA Präzipitat wurde in Wasser in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst. Abschließend wurde die Konzentration der RNA mittels photometrischer Messung bestimmt und mit einer Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese auf Menge und Verunreinigungen kontrolliert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für cDNA-Synthese und für weitere Markierungsreaktionen war es notwendig, die eingesetzten Mengen an Nukleinsäure zu bestimmen. Die Konzentration von DNA und RNA wurde nach Sambrook & Russel (2001) bestimmt.

2.2.6 RNA Gelelektrophorese

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurden die Proben auf ein Formaldehyd-Agarose Gel aufgetragen (Sambrook & Russel, 2001). RNA-Proben können - mit Formamid behandelt - in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Ein Volumen von 3 µl RNA-Proben wurde vorgelegt und mit 9 µl *Loading Buffer* und 0,3 µl EtBr Lösung (10mg/ml) aufgefüllt. Diese Proben wurden für 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1,2 µl RNA Dye wurden die RNA Proben in die Taschen mit FA Gel Puffer beschichteten Formaldehyd-Agarose Gels (1,2%) aufgetragen. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte für 1 h bei 100 V. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators (312 nm) wurde die aufgetrennte RNA zur Fluoreszenz angeregt und konnte so betrachtet werden. Zur Geldokumentation wurde die Software IDA (Raytest, USA) benutzt.

2.2.7 Labelling und Hybridisierung des MPS-*microarrays*

2.2.7.1 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese erfolgte eine RNA Konzentrationsbestimmung. Dafür wurde die RNA Lösung 1:50 verdünnt und die Absorption im Spektrometer bestimmt.

Die cDNA Synthese erfolgte gemäß dem Protokoll von Affymetrix mit 10 µg gesamt RNA, dabei wurden je 5 µg RNA aus *M. haemolytica* und *P. multocida* vereinigt.

Primer Hybridization Mix:

RNA	10,0	µg
<i>Random Primers</i>	10,0	µl
H ₂ O	x	µl
Endvolumen	30,0	µl

Der *Primer Hybridization Mix* wurde für 10 min bei 70 °C und für 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Ein cDNA-Synthese *Mastermix* wurde vorbereitet und für 30 s bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

cDNA Synthese Mix:

	Volumen	Konzentration
RNA/ <i>Primer Hybridization Mix</i>	30,0 µl	-
5x 1st Strand Buffer	12,0 µl	1 x
100mM DTT	6,0 µl	10,0 mM
10mM dNTPs	3,0 µl	0,5 mM
SUPERase In	1,5 µl	0,5U/µl
SuperScript II	7,5 µl	25,0U/µl
Endvolumen	60,0 µl	

Die cDNA-Synthesereaktion erfolgte für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 37 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C. Das SuperScriptII Enzym wurde 10 min bei 70 °C inaktiviert und die Proben dann auf Eis abgekühlt. Die RNA wurde durch die Zugabe von 20 µl 1N NaOH und durch Inkubation für 30 min bei 65 °C hydrolysiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 µl 1N HCl neutralisiert. Zur Aufreinigung der cDNA wurde das Standardprotokoll für den QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) befolgt. Die cDNA wurde mit 42 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentration der cDNA wurde photometrisch bestimmt.

2.2.7.2 cDNA-Fragmentierung

Vor der Markierung wurde die cDNA mit DNaseI zu einer Fragmentgröße von ca. 200 bp degradiert. Die DNaseI wurde für diese Reaktion auf 0,6 U/µl in 1 x *One-Phor-All Buffer* verdünnt.

	Volumen	Konzentration
10x <i>One-Phor-All Buffer</i>	5,0 µl	1 x
cDNA	36,0 µl	
DNase I	X µl	0,6 U/µg _{cDNA}
Nuklease freies H ₂ O	9-X µl	-
Endvolumen	50,0 µl	

Die Fragmentierungsreaktion erfolgte für 10 min bei 37 °C. Die DNaseI wurde durch die Inkubation für 10 min bei 98 °C inaktiviert. Die Proben wurden

anschließend auf Eis abgekühlt. Ein Aliquot von ca. 200 ng cDNA wurde für den *Gel shift Assay* zur Kontrolle der Fragmentierungseffizienz entnommen.

2.2.7.3 Terminales Labelling der fragmentierten cDNA

Die fragmentierte cDNA wurde anschließend am 3' Ende mit biotinyliertem dUTP (BioArray Kit, Enzo) markiert.

	Volumen	Konzentration
5x <i>Reaction Buffer</i>	20,0 µl	1 x
10x CoCl ₂	10,0 µl	1 x
100x Biotin-dUTP	1,0 µl	1 x
50x Terminal Deoxynucleotide Transferase	2,0 µl	1 x
Fragmentierte cDNA	50,0 µl	
Nuklease freies H ₂ O	15,0 µl	-
Endvolumen	100,0 µl	

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 µl 0,5M EDTA gestoppt. Ein Aliquot von ca. 200 ng cDNA wurde für den *Gel shift Assay* zur Kontrolle der Markierungseffizienz entnommen.

2.2.7.4 Gel-shift Assay

Um die Qualität der fragmentierten cDNA und die Markierungseffizienz vor und nach dem Markieren zu überprüfen, wurden 200 ng DNA Aliquots auf einem 6%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Herstellung des Polyacrylamidgels erfolgte nach dem Protokoll von Affymetrix (USA).

Zur Qualitätskontrolle wurden 200 ng cDNA-Proben mit jeweils 4 µl NeutrAvidin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels gegeben. Die Laufzeit betrug 45 min bei 100 V in 1% TBE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel für 10 min in SYBR Gold im Dunkeln gefärbt und unter UV Licht (IDA) ausgewertet.

2.2.7.5 Hybridisierung markierter cDNA auf den MPS-microarray

Die *microarrays* wurden vor dem Hybridisieren in MES Puffer (pH 6,5) für 10 min bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungssofen vorinkubiert.

Für die Hybridisierung wurden 2,5 µg der cDNA eingesetzt. Die Hybridisierungslösung wurde wie folgt zusammengesetzt:

	Volumen	Konzentration
2 x MES Hybridisierungspuffer (pH 6,5)	100,0 µl	1 x
3nM Control Oligo B2	3,3 µl	50,0 pM
10mg/ml <i>Herring Sperm</i> DNA	2,0 µl	0,1mg/ml
50mg/ml BSA	2,0 ml	0,5mg/ml
Fragmentierte markierte cDNA	x µl	2,5 µg
H ₂ O	auf 207,0 µl	-
Endvolumen	~ 207,0 µl	

Die Hybridisierungslösung wurde für 5 min bei 99°C denaturiert und nach dem Abkühlen auf Eis für weitere 5 min bei 45°C inkubiert. Die Lösung wurde für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Vorinkubationslösung auf dem *microarray* durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Die *microarrays* wurden für 16 h bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungssofen inkubiert.

Das Waschen der *microarrays* erfolgte in der Waschstation nach der Vorschrift von Affymetrix. Nach dem Waschen erfolgte das Einlesen der *Arrays* im Gene *microarray* Scanner.

2.2.8 Bioinformatische Auswertung der Affymetrix *microarrays*

Zur Auswertung der Hybridisierungssignale des MPS *microarrays* wurde die Affymetrix Software MAS 5.0 und die InforMax Softwares Vector Xpression 3.0 und Vector PathBlazer 2.0 verwendet (Abb. 13). In der MAS 5.0 erfolgt eine Normalisierung, die für Ungenauigkeiten beim Pipettieren zwischen *Arrays* korrigierte. In den durchgeführten Experimenten hybridisierten 85% ($\pm 3,5\%$) der Oligonukleotid-Sequenzen des *microarrays* mit der cDNA-Sequenz der jeweiligen Proben. Diese hohe Hybridisierungsrate (Prozent *present call*) stellte sicher, dass potentielle Expressionsveränderungen der meisten (85% ($\pm 3,5\%$)) Gene des *M. haemolytica* bzw. *P. multocida* Genomes abhängig von den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen analysiert wurden. Der Hintergrundwert lag bei allen Experimenten unter dem vom Hersteller (Affymetrix) angegebenen Grenzwert von 60. Nur Replikate bei denen weniger als 3% aller transkribierter Gene ≥ 2 -fach variierten, wurden in die Analyse eingebracht (% *Change*). Die *Scatter Blot* Analyse veranschaulichte dieses Qualitätsmerkmal (Abb. A1). In diesem Beispiel lag die Anzahl unterschiedlich exprimierten Gene bei 1,3 %. Die Expressionswerte verschiedener Haushaltsgene (*recA*, *rpS17*) wurden überprüft und zeigten keine signifikan-

ten Veränderungen durch die Zugabe unterschiedlicher Antibiotika. Die einzige Ausnahme war die Induktion der Expression von *recA* nach der Inkubation mit Enrofloxacin. Die Regulation von *recA* durch Enrofloxacin war durch deren Wirkmechanismus bestimmt. Daher wurde für die Qualitätsanalyse der Enrofloxacin-Daten *topA* als Referenzgen herangezogen.

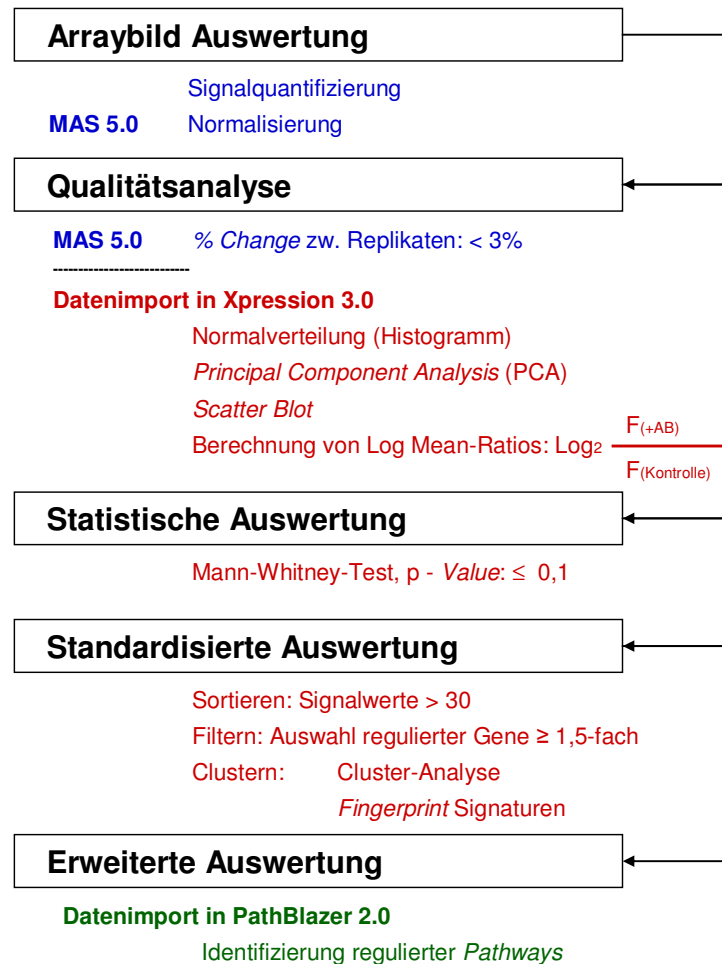


Abb. 13. Flussdiagramm der Affymetrix-microarray Datenanalyse.

Die Signalwerte (*arbitrary fluorescent units*) wurden abzüglich der Hintergrundfluoreszenz in Vector Xpression 3.0 geladen. Weitere Qualitätsanalysen umfassten die Überprüfung auf Normalverteilung durch Histogramm Analysen; sowie eine *scatter blot* Analyse, die Berechnung des Korrelationskoeffizients und eine *principle component analysis* (PCA) zur schnellen Erfassung von stark abweichenden Replikaten. Die statistische Signifikanz der Regulation wurde durch einen Mann-Whitney-Test abgesichert ($p\text{-Value} \leq 0,1$). Die Gene mit gemessenen Signalwerten unter 30 (Kontrolle und Experiment) wurden als nicht exprimiert angesehen und aus der Analyse ausgeschlossen. *cluster*-Analysen ermöglichten Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten in Gruppen einzuordnen und dementsprechend die Antibiotika-induzierten Ex-

pressionsprofile zu gruppieren. Die hierarchische *cluster*-Analyse erfolgte (wenn nicht anders vermerkt) unter der Anwendung des Korrelationseffizienten sowie der *unweighted link* Methode. Anschließend wurden die regulierten *pathways* für jede Wirkstoffklasse mit Hilfe von InforMax Software Vector PathBlazer 2.0 identifiziert.

2.2.9 Klonierungen

2.2.9.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Für die Charakterisierung, Isolierung und Linearisierung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen verwendet (Sambrook & Russel, 2001). Für analytische Ansätze wurde maximal 1 µg DNA mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease ad 20 µl für 1 bis 2 h bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert. Für präparative Ansätze kann auch über Nacht inkubiert werden. Nach einem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russel, 2001) auf Größe, Menge und Verunreinigungen kontrolliert.

2.2.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach dem Restriktionsverdau von DNA, können einzelne Fragmente mit Hilfe von Ligasen miteinander verknüpft werden. Dabei wird die neu Entstehung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einem 3'-Hydroxyl-Ende und einem 5'-Phosphat-Ende einer doppelsträngigen DNA von der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert (Sambrook & Russel, 2001). Es wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet:

Bis zu 1 µg DNA wurde eingesetzt (das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug bei vergleichbarer Länge \approx 1:3) 2 µl 10 x T4 DNA Ligase Puffer und 1 bis 5 Einheiten Ligase wurden ad 20 µl zusammengegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in einer Transformation eingesetzt.

2.2.9.3 Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerasen

Es wurden pCRII-TOPO-Vektoren von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet (siehe Anhang). Diese Vektoren liegen linearisiert mit Desoxythymidin-Überhängen vor. An diesen Enden ist die Topoisomerase des Vaccinia-Virus kovalent gebunden (Sambrook & Russel, 2001). Mit Hilfe eines solchen Vektors können PCR-Produkte direkt in ein Plasmid kloniert werden. Die Taq-Polymerase fügt an die 3'-Enden eines PCR-Produktes ein einzelnes, über-

hängendes Desoxyadenosin an. Dieses Fragment kann in den linearisierten pCRII-TOPO-Vektor inseriert werden, der an seinen 3'-Enden ein einzelnes überhängendes Desoxythymidin besitzt. Durch Insertion des PCR-Produkts in den Vektor wird die Topoisomerase entfernt (Sambrook & Russel, 2001). Für diese Klonierung wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Das Produkt wurde in elektrokompente Bakterien transformiert und auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum (Kanamycin) ausplattiert. Anschließend wurden die unter dem Selektionsdruck gewachsenen Kolonien einer Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse unterzogen, um zu überprüfen ob das PCR-Produkt in den Vektor eingefügt wurde.

2.2.9.4 Transformation von Bakterien

Ein Aliquot von elektrokompenten Zellen *E. coli* Top 10 (Invitrogen) wurde auf Eis aufgetaut. Ein bis zwei Mikroliter des Ligationsansatzes wurden mit 40 µl Zellsuspension vermischt und in eine gekühlte Elektroporationskuvette gegeben. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Kuvette befinden. Die Elektroden der Kuvette wurden mit einem Tuch getrocknet und das Gefäß wurde in das Elektroporationsgerät eingesetzt. Mit dem Capacitance „Extender Plus von Bio-Rad“ wurde (Spannung: 2 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF) elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurden 200 µl LB-Medium auf die Zellen gegeben, anschließend wurden diese in ein Greiner-Reaktionsgefäß (15 ml) überführt und 1 h bei 37°C ohne Zugabe eines Antibiotikums mit einem Schüttelinkubator geschüttelt (300 Umin⁻¹). Die 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotika zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurde ein Vektor lediglich retransformiert, so wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe einer Impföse verdünnt ausgestrichen.

Die verwendeten Plasmide kodierten für Resistenzgene (z.B. Kanamycin - Resistenzgen). Diese sind im Genom der kompetenten Bakterien (*E.coli*) nicht vorhanden. Durch den Selektionsdruck des Mediums konnten nur Bakterien wachsen, die über das entsprechende Plasmid verfügten. Mit jedem Teilungszyklus der Bakterien wurde jede Kopie des Plasmids und somit die neukombinierte DNA repliziert. Damit verbunden wurde das Plasmid amplifiziert und konnte durch geeignete Methode aufgereinigt werden.

Für beide Methoden wurden Kontrollen durchgeführt. Zur Überprüfung der Selektivität der LB-Agarplatten mit Antibiotikum wurden Transformationen ohne DNA durchgeführt und zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden Transformationen mit Vektoren bekannter Konzentrationen durchge-

führt. Bei Ligationsansätzen wurde die Religationshäufigkeit des Vektors ermittelt, indem identische Ansätze ohne Insertions-DNA ausplattiert wurden.

2.2.9.5 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA durch Chromatographie mit Hilfe von Silikamembranen ist von Sambrook und Russel (2001) beschrieben worden. Für die Durchführung der Präparation wurden Qiagen Plasmid-Mini/Midi/Maxi-Kits eingesetzt. Je nach Menge der flüssigen Bakterienkultur wurde entweder eine Mini- (3 ml), Midi- (50 ml) oder Maxipräparation (100 ml) nach dem Standardprotokoll von Qiagen durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Pellet Paint Co-Precipitant* (Novagen) aufkonzentriert.

Die so präparierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsverdauen und Gelelektrophorese (Sambrook & Russel, 2001) auf ihr Restriktionsmuster überprüft und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.2.10 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden entweder manuell oder mit einem Pipettierroboter (Hamilton Microlab Star) für die Sequenzierung vorbereitet. Die Analyse der aufgereinigten Reaktionsansätze wurde entweder auf dem ABI 3730xl DNA Analyzer oder dem ABI 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Foster City, USA) durchgeführt. Grundlage der Sequenzierung war die Didesoxynukleotidmethode (Sanger *et al.*, 1977).

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA wurde die PCR (*polymerase chain reaction*; Polymerasekettenreaktion) verwendet (Sambrook & Russel, 2001). Die PCR wurde zur Amplifikation von Kontroll-DNA-Fragmenten für die *real-time* PCR (Eichkurve) verwendet. Für eine PCR wurden in der Regel 5 µl PCR-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl MgSO₄ (50mM), jeweils 0,3 µl der Primer (100mM), 10 pg – 200 ng DNA und 1 µl (5 U) Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) mit Wasser ad 50 µl zu einem Ansatz zusammengefügt.

PCR Bedingungen:		
95°C	2 min	
94°C	30 sec	Denaturierung
X°C	30 sec	Hybridisierung
68°C	1 min pro kb	Synthese
68°C	10 min	

} 35 Zyklen

X°C entspricht der Annealing-Temperatur der Primer, die von der Firma MWG, Ebersberg anhand des GC-Gehaltes kalkuliert wurde. Die Schmelztemperatur von Primern mit bis zu 14 Nukleotiden wurde nach der Methode von Suggs *et al.* (1981) und Thein *et al.* (1986) berechnet. Die Schmelztemperatur von Primern mit mehr als 14 Nukleotiden wurde nach der von Sambrook und Russel beschriebenen Methode (2001) berechnet.

Abschließend wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese auf Größe, Menge und Verunreinigungen analysiert, bevor das Produkt in weiteren Reaktionen eingesetzt wurde.

2.2.12 Real-time PCR

Die *real-time* PCR wurde unter Verwendung von SYBR Green PCR Master Mix auf einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in Triplikaten in 96-well Platten nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt (www.appliedbiosystems.com). Die Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express 2.0.0 (Applied Biosystems) nach den empfohlenen Spezifikationen des Herstellers ausgewählt (Tab. A1, A2). Präparation der cDNA erfolgte mit dem SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen nach dem Herstellerprotokoll aus den gleichen RNA-Proben, die für die *microarrays* eingesetzt wurden. Die *real-time* PCR wurde in 25 µl Reaktionsansatz mit 10 ng und 100 ng cDNA durchgeführt. Die PCR Bedingungen wurden wie folgt ausgewählt: Hotstart-Taq Aktivierung bei 50° C für 2 min, Template Denaturierung bei 95° C für 15 min; 40 Zyklen bei 95° C für 15 sec und bei 60° C für 1 min. Im Anschluss erfolgte eine Dissoziationskurvenanalyse, die bei 60° C für 15 sec bis 95° C für 15 sec mit einer Heiz- und Kühlrate von 2% aufgezeichnet wurde. Hiermit wurde verifiziert, dass keine unspezifischen Produkte oder Primer-Dimere amplifiziert wurden. Die Ct (*threshold cycle*)-Werte des Amplifikationsplots wurden mit der Abi Prism 7000 SDS 1.1 Software bestimmt. Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde mit Hilfe der Standardkurvenmethode (User Bulletin#2,

10/2001; Applied Biosystems) durchgeführt. Hierzu wurde für jede unterschiedliche cDNA Probe und das gewählte Referenztranskript (*recA* bzw. *topA* (*topA* nur für das Enrofloxacin-Experiment)) eine Standardkurve mit den entsprechenden Verdünnungen der cDNA erstellt. Die Transkription der Referenzgene wurde in den jeweiligen Experimenten durch die Änderung der Wachstumsbedingungen nicht beeinflusst. Somit eigneten sich diese für eine Normalisierung der Ergebnisse, um die möglichen Pipettierfehler auszugleichen. Für jede cDNA Probe wurde die Menge des Zielgens und der Referenz mit Hilfe der dazugehörigen Standardkurve ermittelt. Anschließend wurde der ermittelte Wert des Zielgens durch den Wert der Referenz geteilt:

$$\frac{\text{Expressionssignal}(\text{GenX})}{\text{Expressionssignal}(\text{Referenzgen})} = {}_{norm}ES .$$

Hierdurch wurde eine normalisierte

Menge des Zielgens (${}_{norm}ES$) in der jeweiligen cDNA erhalten. Der relativen Expressionsgrad für das normalisierte Zielgen wurde erhalten, indem dieser Wert durch den ebenfalls normalisierten Wert des Zielgens des entsprechenden Kontrollansatzes ohne Stimulation (Kalibrator) dividiert wurde:

$$\text{Relative Expressionsgrad GenX} = \frac{{}_{norm}ES_{AB}}{{}_{norm}ES_{Kontrolle}} .$$

Die ermittelten Werte wurden

als n-fache Differenz relativ zum Kalibrator bzw. als \log_2 Werte angegeben.

2.2.13 Eisen-Assay

Je 100 μl der Bakterien Suspensionen ($\text{OD}_{578} \sim 0,5$) wurden auf BHI-Agarplatten mit und ohne 150 μM Desferoxamine Mesylate (Desferal), bzw. zusätzlich mit und ohne $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{2}$ und $1 \times$ MHK der Antibiotika Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin ausplattiert. Danach wurden sterile Testblättchen mit Hilfe eines *Disc Dispencers* (Oxoid, UK) aufgelegt (Abb. 14) und mit je 25 μl der zu prüfenden Testsubstanzlösung getränkt. Die Testlösungen holo-Transferrin (Rind), Hämoglobin (Rind) und FeCl_3 beinhalteten die Eisenquellen für die Bakterien. H_2O und PBS getränkte Testblättchen dienten als Lösungsmittelkontrollen. Die Platten mit Antibiotika und ohne Desferal dienten als Wachstumskontrollen.

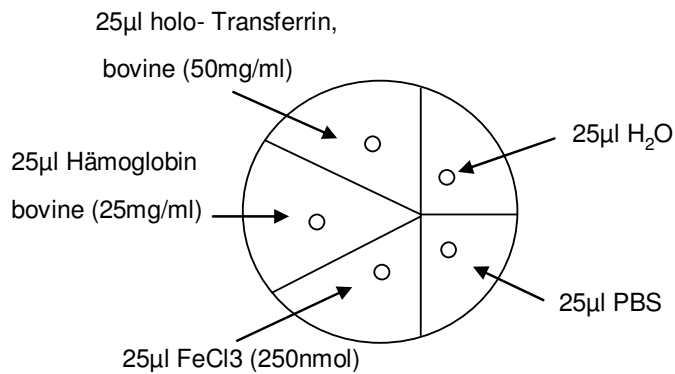


Abb. 14. Belegungsschema von BHI-Desferal-Antibiotika-Agarplatten mit den Testblättchen. Nach dem Verteilen von Bakteriensuspension wurden die Testblättchen mit Hilfe eines *Disc Dispencers* (Oxoid, UK) auf die Agarplatten aufgebracht und mit je 25 µl der Testsubstanzen getränkt.

Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C im Brutschlank inkubiert und anschließend wurde das Wachstum beurteilt und dokumentiert. Das Wachstum um ein Filterplättchen wurde nach der Größe des bakteriellen Wachstumshofes bewertet:

- kein Wachstum,
- + - geringeres Wachstum mit Wachstumszone Diameter < 0,5 cm,
- ++ - Wachstum mit Wachstumszone Diameter 0,5 < 1 cm und
- +++ - Wachstum mit Wachstumszone Diameter > 1 cm

2.2.14 Elektronenmikroskopie

Etwa 2×10^8 Bakterien wurden mit Ferritin (10 mg/ml) für 30min bei RT gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen in 2 % Glutaraldehyd im EM-Puffer bei 4°C für 60 min fixiert (Jacques & Foiry, 1987). Danach wurde 4-mal für 10 min mit EM-Puffer bei RT gewaschen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen dreimal in Cacodylat-Puffer (1x) gewaschen. Als zweites Fixativ wurde eine 1,5 % Osmiumtetroxid Lösung benutzt (für 60 min bei 4°C). Erneut wurden die Zellen einmal mit Cacodylat-Puffer (1x) und dreimal mit H₂O bidest. gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 0,5% Uranylacetat (0,5 ml) 1 h bei RT. Der folgende Waschschritt wurde mit H₂O bidest. ausgeführt. Zur Entwässerung der Zellen wurde eine aufsteigende Reihe von Ethanol-Lösungen (jeweils 1 ml) verwendet. Die Zellen wurden jeweils 5 min in jeder Lösung (50%, 70%, 95% und 100% Ethanol) entwässert. Die Entwässerung in 100% Ethanol wurde dreimal wiederholt. Das Ethanol wurde durch dreimaliges Inkubieren mit Propylenoxid

(Überführungsmedium) ausgetauscht, bevor es zur Einbettung der Präparation kam. Die Einbettung wurde mittels des Epoxidharzes Epon 128 vorgenommen (Luft, 1961). Zunächst wurden die Proben schrittweise in einem Epon- Propylenoxidgemisch (1:1, für 60 min, RT) und dann mit reinem Epon inkubiert (für 60 min, RT) und schließlich in Beem[®]-Cups überführt. Die Polymerisation erfolgte für 12 h bei 45 °C und anschließend für 24 h bei 60 °C. Alle Schritte erfolgten in Eppendorf-Cups in einem jeweiligen Gesamtvolumen von 1 ml. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Zellen jeweils 30 s (50 % Epon 4 min, reines Epon 16 min) mit der Beckman Microfuge B abzentrifugiert (13.000 g, RT).

Nach der Polymerisierung wurden die eingebetteten Zellen mit einem LKB 11800 Pyramitone[®] zu Trapezen (ca. 0,5 mm Basislänge) getrimmt und mit einem Ultramikrotom OM U3 (Reichert) geschnitten. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte mit Kupfernetzchen (Square 200 mesh, 45 µm Maschenweite) aufgefischt. Zum Kontrastieren der Schnitte wurden die Netzchen (Schnitte nach unten) auf einen 50 µl 5% Uranylacetat-Tropfen für 60 min bei RT gesetzt (Lewis & Knight, 1977). Die Netzchen wurden mit H₂O bidest. gewaschen. Danach wurden sie 45 s bei RT in eine Bleicitratlösung getaucht, wieder gewaschen und getrocknet, bevor sie am Elektronenmikroskop eingeschleust wurden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden die IMAGO[®]-EM23 Schwarzweiß-Negativfilme (Ahlemeyer GmbH, Duisburg) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Referenzkompendium globaler Expressionsprofile von *P. multocida* und *M. haemolytica*

3.1.1 Erstellung und Validierung des Referenzkompendiums

Der Wirkmechanismus (*mode of action*, MoA) eines Antibiotikums basiert auf der Wechselwirkung des Antibiotikums (*drug*) mit dem Zielprotein (*target*), wodurch essentielle zelluläre Funktionen inhibiert werden und die Bakterien absterben oder sich nicht weiter vermehren können. Diese spezifische Störung der zellulären Funktionen führt zu charakteristischen transkriptionellen Reaktionen, die sich häufig in der Änderung der Transkription relevanter Zielgene widerspiegeln.

In dieser Arbeit wurden die Veränderung im Transkriptom von *M. haemolytica* und *P. multocida* nach der Behandlung mit acht verschiedenen Antibiotika mittels *microarrays* detektiert. In einem Referenzdatensatz, dem Referenzkompendium, wurden die ermittelten Transkriptionsprofile zusammengefasst und anschließend für eine MoA Studie einer neuen antibiotischen Substanz gegen *M. haemolytica* und *P. multocida* herangezogen.

Das erste Auswahlkriterium zur Selektion der Antibiotika für das Referenzkompendium war, möglichst viele unterschiedliche Wirkmechanismen zu erfassen. Die klinische Anwendungshäufigkeit der Antibiotika zur Behandlung von Pasteurellosis stellte ein zweites Kriterium dar. Die ausgewählten acht Antibiotika des Referenzkompendiums repräsentieren fünf unterschiedliche Wirkmechanismen: Inhibition der DNA-Replikation (Novobiocin und Enrofloxacin), Inhibition der Transkription (Rifampicin) und der Translation (Florfenicol und Tilmicosin), sowie die Inhibition der Folatbiosynthese (Trimethoprim und Brodimoprim) und der Zellwandbiosynthese (Cefquinom). Im Folgenden wird zuerst auf die Erstellung des Referenzkompendiums und die anschließend durchgeführte globale Datenanalyse der Expressionsprofile eingegangen. Danach werden die spezifischen Expressionsmuster der Erreger nach der Antibiotikabehandlung beschrieben. Das Hauptaugenmerk der Datenanalyse richtete sich aufgrund des besseren Verständnisses der metabolischen Prozesse und der Virulenzeigenschaften auf die Expressionsprofile von *P. multocida*. Die Expressionsdaten von *M. haemolytica* dienten dem Vergleich

zu *P. multocida*, mit dem Ziel, die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede in der Genregulation beider Erreger darzustellen.

Für die Aufnahme der Expressionsprofile wurde die einfache und zehnfache minimale Hemmkonzentration (MHK) der ausgewählten Antibiotika eingesetzt. In bereits publizierten Expressionsstudien mit einfacher und mehrfacher MHK konnten bei anderen Bakterien die Regulation von Zielgenen beobachtet und Signaturgene identifiziert werden (Gmünder *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2004). Weiterhin ermöglichte diese Konzentrationsauswahl den Vergleich mit publizierten Expressionsstudien anderer Bakterien. Für den *M. haemolytica* Stamm M7/2 und den *P. multocida* Stamm L386 waren für die verwendeten Antibiotika keine MHK-Werte bekannt. Daher wurden für beide Stämme die MHK-Werte mit Hilfe der standardisierten Mikrodilutionsmethode (2.2.1) ermittelt (Tab. 5). Die resultierenden MHK-Werte lagen innerhalb der Literaturwerte für andere *M. haemolytica* und *P. multocida* Stämme (Tab. 5). Die etwas kleineren MHK-Werte von Novobiocin und Rifampicin für *M. haemolytica* und Trimethoprim und Rifampicin für *P. multocida* deuteten auf eine höhere Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Stämme hin. Für den potentiellen Virulenzfaktor Inhibitor C-30 konnten keine MHK-Werte bestimmt werden, da diese Substanz keine antibiotische Wirksamkeit besitzt (Hentzer *et al.*, 2003). Die Expressionsprofile für diese Substanz wurden mit 10 μ M und 50 μ M aufgenommen, da bei diesen Konzentrationen ein Einfluss auf die Virulenzgenregulation von *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden konnte (Hentzer *et al.*, 2003).

Zur Aufnahme eines kinetischen Expressionsprofils von *M. haemolytica* und *P. multocida* wurden die Bakterien nach der Inkubation mit der einfachen MHK nach 10 und 30 min geerntet. Die zehnfache MHK diente zur Messung der Dosisabhängigkeit der schnellen (10 min) Transkriptionsänderung. Aufgrund der bekannten sekundären Effekte von Antibiotika in Gegenwart der zehnfachen MHK (Gmuender *et al.*, 2001) wurde die längere Inkubation (30 min) mit der zehnfachen MHK nicht untersucht. Als Kontrolle dienten in den Experimenten Bakterien, denen kein Antibiotikum zugesetzt wurde. Als Maßeinheit für den Expressionsunterschied eines Gens wurde der binäre Logarithmus (Log_2) aus dem Verhältnis der Expressionswerte des Gens von Antibiotika behandelten zu unbehandelten Bakterien berechnet (auch *signal log ratio* (SLR) genannt). In Anbetracht der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Tab. 6) wurden Gene mit einem $\text{SLR} \geq 0,59$ (Faktor 1,5) als induziert bzw. $\text{SLR} \leq -0,59$ als reprimiert bezeichnet.

Tabelle 5. Minimale Hemmkonzentration der Antibiotika für den *P. multocida* Stamm L386 und den *M. haemolytica* Stamm M7/2.

Antibiotikum	<i>M. haemolytica</i> MHK [$\mu\text{g/ml}$]	<i>P. multocida</i> MHK [$\mu\text{g/ml}$]
Novobiocin (NB)	16,0 (64,0; Prescott <i>et al.</i> , 2000)*	4,0 (0,8-6,4; Darnell <i>et al.</i> , 1987)
Enrofloxacin (ENR)	0,016 (0,015-0,5; Mevius <i>et al.</i> , 2000)	0,008 (0,004-0,125; Mevius <i>et al.</i> , 2000)
Florfenicol (FFC)	1,0 (1,0-2,0; Priebe <i>et al.</i> , 2003)	0,5 (0,5-1,0; Priebe <i>et al.</i> , 2003)
Tilmicosin (TIL)	4,0 (\leq 16,0; NCCLS, 2003)	4,0 (\leq 8,0; NCCLS, 2003)
Cefquinom (CEF)	0,031 (k. A.)	0,063 (k. A.)
Rifampicin (RIF)	0,125 (1,0; Prescott <i>et al.</i> , 2000)	0,5 (1,0; Prescott <i>et al.</i> , 2000)
Trimethoprim (TRM)	0,25 (k. A.)	0,5 (4,0; Prescott <i>et al.</i> , 2000)
Brodimoprim (BR)	0,125 (k. A.)	0,25 (k. A.)
Thiazin (TZ)	0,25 (k. A.)	0,031 (k. A.)

* Literaturwerte in Klammern. Ein Konzentrationsbereich bezieht sich auf Daten von mehreren Stämmen und Serotypen von *M. haemolytica* und *P. multocida*. NCCLS: *national committee for clinical laboratory standards*, k. A.: keine Angaben.

Zur Absicherung der Expressionsdaten wurden die Ergebnisse der *microarray*-Experimente mit einer zweiten unabhängigen Methode verifiziert. Da die *real-time* PCR am Besten zur Quantifizierung von mRNA geeignet ist (Sambrook & Russel, 2001), wurden die *microarray*-Daten einiger ausgewählter Gene auf diese Weise nachgeprüft. Die Auswahl betraf Gene von *P. multocida*, die bei den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen stärker, schwächer bzw. nicht differentiell exprimiert wurden (Tab. 6).

Tabelle 6. Verifizierung der *microarray* Experimente durch *real-time* PCR für ausgewählte *P. multocida* Gene.

Antibiotikum	<i>P. multocida</i> Gene	Expressionsänderung (Log ₂)		
		<i>microarray</i>	<i>real-time</i> PCR	
1xMHK Novobiocin	10 min			
		<i>topA</i>	-4,00	-4,69
		<i>hexD</i>	-2,79	-2,60
		<i>hexB</i>	-3,21	-2,10
		<i>gyrA</i>	1,34	1,93
		<i>gyrB</i>	1,17	2,36
	30 min			
		<i>topA</i>	-4,20	-5,13
		<i>hexD</i>	-2,82	-3,16
		<i>hexB</i>	-2,97	-2,67
	<i>gyrA</i>	1,15	0,74	
	<i>gyrB</i>	1,58	1,66	
1xMHK Enrofloxacin	10 min			
		<i>hexD</i>	-0,21	-0,51
		<i>hexB</i>	0,01	-0,12
	30 min			
	<i>hexD</i>	-0,08	0,08	
	<i>hexB</i>	0,04	0,37	
1xMHK Florfenicol	10 min			
		<i>topA</i>	0,62	0,89
		<i>hexD</i>	-1,28	-2,50
		<i>hexB</i>	-2,48	-2,54
	30 min			
		<i>topA</i>	0,79	0,59
	<i>hexD</i>	-3,18	-4,00	
	<i>hexB</i>	-3,89	-4,50	
1xMHK Tilmicosin	10 min			
		<i>hexD</i>	-2,16	-1,15
		<i>hexB</i>	-2,84	-1,30
	30 min			
	<i>hexD</i>	-5,12	-4,40	
	<i>hexB</i>	-4,77	-3,67	

Die Ergebnisse der *real-time* PCR Experimente stimmten sehr gut mit den *microarray*-Daten überein (Tab. 6). Der zuvor ausgewählte untere Regulationsgrenzbereich (Log₂ ≥ 0,59) wurde am Beispiel der geringfügigen Induzie-

rung der Transkription des *topA* Gens nach 10-minütiger Inkubation mit Florfenicol mittels beider Methoden ($SLR_{microarray}=0,62$ bzw. $SLR_{real\ time\ PCR}=0,89$) bestätigt. Auch die fehlende differentielle Expressierung der *hexB* und *hexD* Gene durch Enrofloxacin konnte in den *real-time* PCR Experimenten nachgewiesen werden (Tab. 6). Die *real-time* PCR Ergebnisse wurden mit den *microarray*-Daten durch eine Regressionsanalyse verglichen (Abb. 15). Die Steigung der Regressionsgeraden von 1,0 und der Korrelationskoeffizient (r^2) von 0,90 zeigten eine sehr gute Korrelation zwischen den *microarray*- und den *real-time* PCR-Daten.

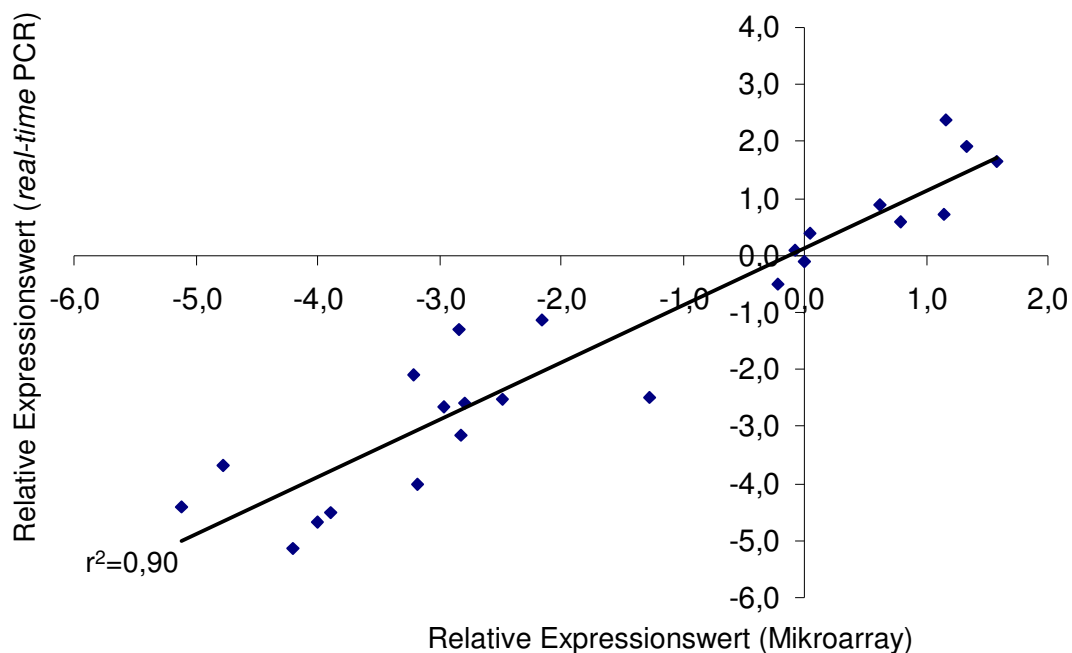


Abb. 15. Korrelation der Expressionsänderungen aus *microarray* und *real-time* PCR. Die logarithmierten Mittelwerte von *P. multocida gyrA*, *gyrB*, *hexB*, *hexD*, *topA*, *recA* bei vier unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Tab. 6) wurden verglichen. Die Regressionsgerade mit dem Korrelationskoeffizienten (r^2) ist eingezeichnet.

3.1.2 Einfluss der Antibiotika des Referenzkompendiums auf das Transkriptom von *P. multocida*

Das erstellte Referenzkompendium von *P. multocida* wurde im nächsten Schritt bioinformatisch analysiert. Die bioinformatische Analyse zielte darauf ab, Ähnlichkeiten und Unterschiede der Transkriptionsprofile in Abhängigkeit von den verwendeten Antibiotika zu finden. Als erstes wurde die Anzahl der Gene, die durch Einsatz der einzelnen Antibiotika zeit- und dosisabhängig reguliert wurden, untersucht.

Insgesamt wurden in *P. multocida* 1466 Gene bei der Verwendung der einfachen MHK der acht Antibiotika des Referenzkompendiums bei 10 und 30 min differentiell exprimiert (eine Excel Datei (Tab. S2) mit allen regulierten Genen ist in Melnikow *et al.*, 2008 publiziert.). Zusätzlich wurden 147 Gene während der Inkubation mit der zehnfachen MHK nach 10 min reguliert.

Tabelle 7. Anzahl der regulierten *P. multocida* Gene nach Inkubation mit den Antibiotika des Referenzkompendiums.

Antibiotikum	Konzentration, Inkubationszeit	Anzahl der differentiell exprimierten Gene			
		Induziert	Reprimiert	Gesamt	% Genome
Novobiocin	1xMHK, 10min	293	490	783	39,15
	1xMHK, 30min	362	433	795	39,75
	10xMHK, 10min	335	508	843	42,15
Enrofloxacin	1xMHK, 10min	10	11	21	1,05
	1xMHK, 30min	36	11	47	2,35
	10xMHK, 10min	34	72	106	5,3
Florfenicol	1xMHK, 10min	189	185	374	18,7
	1xMHK, 30min	262	288	550	27,5
Tilmicosin	1xMHK, 10min	168	235	403	20,15
	1xMHK, 30min	302	364	666	33,3
	10xMHK, 10min	350	459	809	40,45
Trimethoprim	1xMHK, 10min	160	176	336	16,8
	1xMHK, 30min	125	114	239	11,95
	10xMHK, 10min	262	222	484	24,2
Brodimoprim	1xMHK, 10min	113	119	232	11,6
	1xMHK, 30min	112	117	229	11,45
	10xMHK, 10min	200	247	447	22,35
Cefquinom	1xMHK, 10min	1	6	7	0,35
	1xMHK, 30min	40	31	71	3,55
	10xMHK, 10min	16	12	28	1,4
Rifampicin	1xMHK, 10min	234	131	365	18,25
	1xMHK, 30min	396	201	597	29,85
	10xMHK, 10min	82	40	122	6,1

Die einzelnen Antibiotika zeigten beträchtliche Unterschiede im Ausmaß der globalen Veränderung der Genexpression (Tab. 7). Novobiocin verursachte mit fast 40 % aller Gene die stärkste Regulation. Durch Florfenicol, Tilmicosin, Brodimoprim und Trimethoprim wurde die Transkription von 10 % bis 20 % aller *P. multocida* Gene beeinflusst. Die geringsten Änderungen wurden bei

der Verwendung von Enrofloxacin und Cefquinom gefunden. Bei diesen Antibiotika betraf der Unterschied in der Transkription im Vergleich zur Kontrolle weniger als 1 % aller Gene. Außerdem übte auch die Inkubationszeit einen Einfluss auf die Anzahl der differentiell exprimierten Gene aus. So wurde ein Anstieg der Anzahl regulierter Gene bei 30 min gegenüber 10 min Inkubationszeit beobachtet. Lediglich Trimethoprim wich von dieser Regel ab (Tab. 7).

Der konzentrationsabhängige Effekt der einzelnen Antibiotika auf die Expression wurde durch Verwendung der zehnfachen MHK untersucht. Nach 10 min Inkubation mit der zehnfachen MHK wurden mit einer Ausnahme bei allen Antibiotika mehr Gene differentiell exprimiert, als nach der gleichen Zeit mit der einfachen MHK (Abb. 16). Die einzige Ausnahme stellte Rifampicin dar. Hier wurden bei höherer Antibiotika-Konzentration weniger Gene reguliert (Abb. 16). Die größten konzentrationsabhängigen Effekte wurden bei Enrofloxacin, Tilmicosin, Brodimoprim und Cefquinom festgestellt. Dabei wurden im Gegensatz zur einfachen MHK mindestens doppelt so viele Gene bei der zehnfachen MHK differentiell transkribiert. Novobiocin und Trimethoprim übten keinen so starken konzentrationsabhängigen Effekt auf die Anzahl der beeinflussten Gene aus. Die meisten der bei zehnfacher MHK regulierten Gene kodierten für hypothetische Proteine oder Stressproteine, wie z.B. Chaperone (GroES, GroEL) und Hitzeschockproteine (HslU, HslV, DnaK) (Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008).

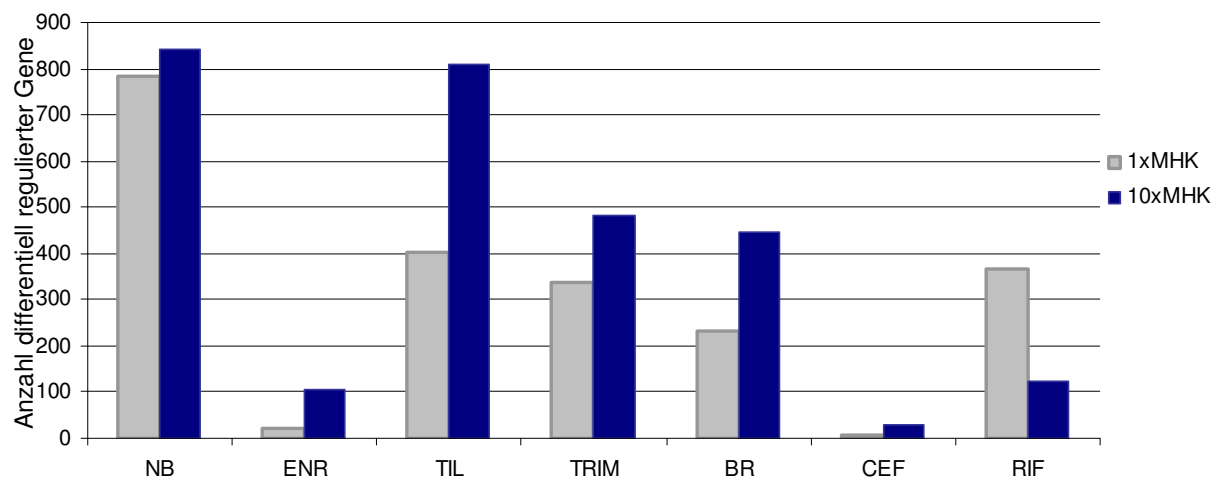


Abb. 16. Anzahl der differentiell exprimierten *P. multocida* Gene in Gegenwart der einfacher bzw. der zehnfachen MHK der Antibiotika des Referenzkompendiums. Die Bakterien wurden für 10 min bei einfachen bzw. zehnfachen Antibiotika MHK inkubiert. NB: Novobiocin, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, TIL: Tilmicosin, TRM: Trimethoprim, BR: Brodimoprim, CEF: Cefquinom, RIF: Rifampicin.

3.1.3 Cluster-Analyse des Referenzkompendiums von *P. multocida*

Die *P. multocida* Expressionsprofile der acht Antibiotika bei einfacher MHK (1xMHK) wurden in der *cluster*-Analyse gemäß der gemessenen Ähnlichkeit in fünf Expressionsgruppen eingeteilt (Abb. 17). Erwartungsgemäß wurden die 10 min und 30 min Zeitpunkte eines Antibiotikums zusammen gruppiert (Abb. 17). Die Expressionsprofile der mit den Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin, sowie mit den Folatbiosynthese Inhibitoren Trimethoprim und Brodimoprim behandelten Kulturen bildeten jeweils eine separate Expressionsgruppe. Im Gegensatz dazu wurden die Expressionsprofile der beiden DNA Topoisomerase-Inhibitoren Novobiocin und Enrofloxacin in zwei separate Gruppen eingeteilt. Dabei bildeten die durch Novobiocin hervorgerufenen Expressionsprofile ein separates *cluster* (Abb. 17). Die Expressionsprofile von Enrofloxacin wurden zusammen mit denen von Cefquinom in ein *cluster* angeordnet.

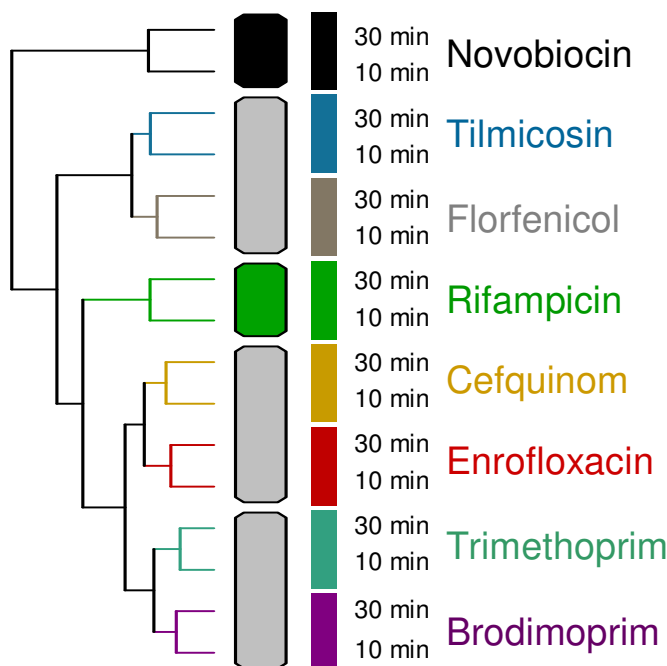


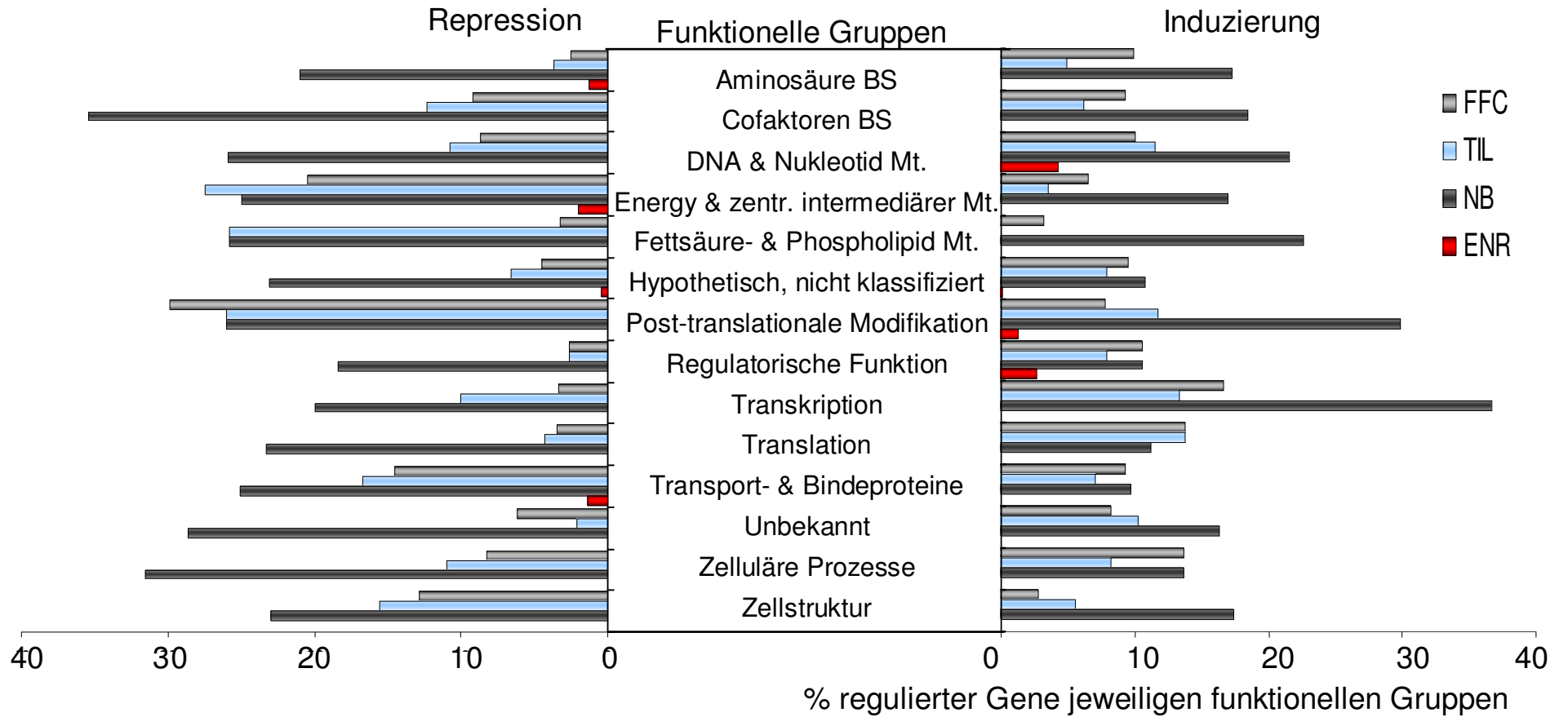
Abb. 17. Hierarchische *cluster* Analyse der Antibiotika-induzierten Expressionsprofilen von *P. multocida*. Ähnliche Expressionsprofile wurden mit Hilfe des *complete linkage cluster* Algorithmus' und der *euclidean distance* Ähnlichkeitsmatrix in *cluster* eingeteilt.

3.1.4 *Fingerprint*-Analyse des Referenzkompendiums von *P. multocida*

Das Ziel der *fingerprint*-Analyse war die Identifizierung charakteristischer Transkriptionsprofile (*fingerprints*) für die unterschiedlichen antibiotischen Wirkmechanismen (MoAs). Weiterhin sollten die *fingerprints* zeigen, welche funktionellen Gruppen am stärksten von den einzelnen Antibiotika auf transkriptioneller Ebene beeinflusst wurden und ob sich daraus der MoA ableiten ließ. Letztlich sollte diese Analyse zeigen, ob bestimmte funktionelle Gruppen generell, d.h. unabhängig vom MoA der Antibiotika, reguliert werden. Für die *fingerprint*-Analyse wurden die regulierten *P. multocida* Gene in 14 verschiedene funktionelle Gruppen (nach May *et al.* 2001) eingeteilt. Die einzelnen funktionellen Gruppen enthielten eine unterschiedliche Anzahl an Genen, z.B. waren dem Fettsäure- & Phospholipid Metabolismus 31 Gene, der Transport- & Bindeproteine Gruppe aber 225 Gene zugeordnet. Um diese Differenzen auszugleichen, wurde die Anzahl der regulierten Gene in Prozent der Gesamtzahl der Gene der jeweiligen funktionellen Gruppe angegeben.

Abb. 18 zeigt eine Übersicht über die funktionelle Einteilung der regulierten *P. multocida* Gene nach 10 min Inkubation mit der einfachen MHK der verschiedenen Antibiotika. Auffällig war eine häufige Beeinflussung der Gene aus drei funktionellen Gruppen: Energie & zentraler intermediärer Metabolismus, post-translationale Protein Modifikation, und Transport- & Bindeproteine. Auch Enrofloxacin und Cefquinom übten einen Einfluss auf die Expression der Gene dieser funktionellen Gruppen aus, obwohl diese Antibiotika die geringste Anzahl an Genen regulierten.

a)



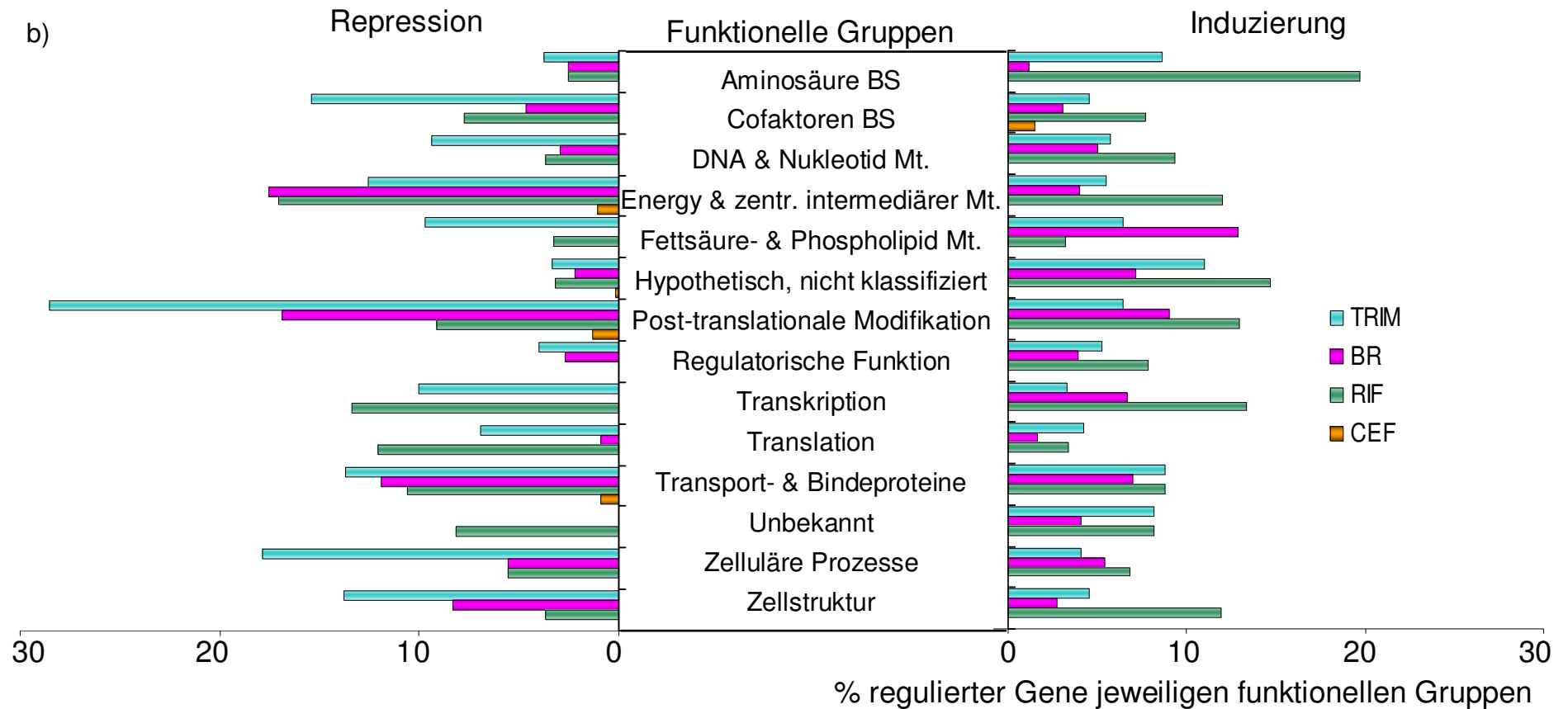


Abb. 18. Einteilung der regulierten Gene von *P. multocida* in funktionelle Gruppen. Die Abszisse zeigt den Anteil regulierter Gene pro funktionelle Gruppe in %. Der Abstand zwischen zwei Strichen auf der Abszisse entspricht 10%. Metab.-Metabolismus. a) NB: Novobiocin, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, TIL: Tilmicosin; b) TRM: Trimethoprim, BR: Brodimoprim, CEF: Cefquinom, RIF: Rifampicin.

Die *fingerprints* der beiden Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin ähnelten einander sehr stark (Abb. 18). In der Transkriptions- und der Translationsgruppe, die die Zielgene dieser Antibiotika umfassten, wurden mehr Gene induziert (17 % und 14 % FFC, 13 % und 14 % TIL) als reprimiert (je 3 % FFC, 10 % und 4 % TIL). Außerdem war eine ausgeprägte Reprimierung der Gene aus der post-translationalen Modifikation Gruppe (30 % FFC, 26 % TIL) gegenüber einer geringen Anzahl an induzierten Genen (8 % FFC, 12 % TIL) für beide Substanzen charakteristisch. Die Kombination dieser beiden Regulationsrichtungen, eine ausgeprägte Induzierung der Transkriptions- und Translationsgruppe und gleichzeitig eine auffallende Reprimierung der post-translationalen Protein Modifikation Gruppe, wurde nur bei Florfenicol und Tilmicosin festgestellt und erscheint somit indikativ (*fingerprint*) für ribosomale Inhibitoren zu sein.

Die Transkriptionsprofile von Brodimoprim, Trimethoprim, Cefquinom und Rifampicin zeigten keine charakteristischen Signaturprofile (Abb. 18). Beide Folatbiosynthese Inhibitoren, Trimethoprim und Brodimoprim, regulierten Gene in jeder der 14 funktionellen Gruppen. Das Fola, *target* der beiden Antibiotika, gehört zu der Cofaktoren Biosynthese-Gruppe. Interessanterweise wurde diese funktionelle Gruppe durch beide Antibiotika unterschiedlich stark beeinflusst. Durch Brodimoprim wurden genauso viele Gene in dieser Gruppe induziert wie reprimiert, durch Trimethoprim hingegen mehr Gene reprimiert (Abb. 18). Auch Rifampicin regulierte Gene in jeder der 14 funktionellen Gruppen. In acht funktionellen Gruppen wurde der gleiche Prozentsatz an Genen induziert wie reprimiert, darunter war auch die Transkriptionsgruppe, die das Zielprotein RNA Polymerase beinhaltet (Abb. 18). In den vier funktionellen Gruppen Aminosäure Biosynthese, hypothetische und nicht klassifizierte Proteine, post-translationale Modifikation und Zellstruktur wurden durch Rifampicin mehr Gene induziert als reprimiert. Weiterhin wurden in der Translations- und der Energie & zentraler intermediärer Metabolismus-Gruppe mehr Gene reprimiert als induziert (Abb. 18). Diese Kombination war indikativ für Rifampicin. Cefquinom, das Antibiotikum mit dem geringsten Effekt auf die globale Genexpression (Tab. 7), induzierte die Expression eines Gens *ribE* aus der Cofaktor Biosynthese-Gruppe (Abb. 18). Dieses Gen kodiert für eine Riboflavin Synthase. Die wenigen durch Cefquinom reprimierten Gene gehörten zu der post-translationalen Modifikation-, der Transport- & Bindeproteine Gruppe und der Energie & zentraler intermediärer Metabolismus Gruppe. Kein Gen der Zellstruktur Gruppe, die die Zielproteine die Transpeptidasen beinhaltet, wurde durch Cefquinom beeinflusst.

Die *fingerprint*-Analyse der DNA Gyrase-Inhibitoren Novobiocin und Enrofloxacin zeigte deutliche Unterschiede in *P. multocida*. Zusätzlich zu den drei allgemein regulierten funktionellen Gruppen beeinflusste Enrofloxacin den DNA & Nukleotid Metabolismus, zu dem auch die Zielgene *gyrA* und *gyrB* der beiden Antibiotika gehören (Abb. 18). 4,3 % der Gene dieser funktionellen Gruppen wurden durch Enrofloxacin induziert, welches überproportional im Vergleich zu den anderen funktionellen Gruppen (max. 2,6 % regulierter Gene) war. Novobiocin verursachte keine überproportionale Regulation dieser Gruppe. Ferner wurde eine deutliche Regulation durch Enrofloxacin innerhalb der regulatorischen Funktionsgruppe (2,6 % induziert) gefunden. Im Vergleich dazu wurden durch Novobiocin mindestens 10% Gene in jeder funktionellen Gruppe induziert oder reprimiert. Am stärksten wurde durch Novobiocin die Transkriptionsgruppe (37 % induziert, 20 % reprimiert) beeinflusst, gefolgt von der post-translationalen Modifikationsgruppe (30 % induziert, 26 % reprimiert) und den Genen, die eine Funktion in der Cofaktoren-Biosynthese haben (18 % induziert, 35 % reprimiert). In der DNA & Nukleotid Metabolismus Gruppe wurden 22 % der Gene induziert und 26 % reprimiert. Kein anderes Antibiotikum des Referenzkompendiums übte einen so starken Einfluss auf diese funktionelle Gruppe aus.

3.1.5 Regulation der Zielgene in *P. multocida* durch die Antibiotika des Referenzkompendiums

Ein wichtiger Aspekt der Analyse war die Regulation der Transkription der *P. multocida* Gene, die für die jeweiligen Zielproteine der Antibiotika kodieren (Regulation der Zielgene). Wie bereits bekannt, wird die Expression dieser Gene bei anderen Bakterien oft durch die Inkubation mit den jeweiligen Antibiotika induziert (Gmünder *et al.*, 2001; Hutter *et al.*, 2004).

Die Auswertung der Expressionsprofile von *P. multocida* ergab, dass einige Antibiotika die Transkription der Zielgene beeinflussten, wogegen andere keinen Effekt auf die Expression ihrer Zielgene ausübten (Tab. 8). So steigerte Novobiocin bereits nach 10 min Inkubation die Transkription der DNA Gyrase um mehr als das Doppelte. Ebenfalls wurde die RNA-Polymerase durch Rifampicin induziert (Tab. 8). Die beiden Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin induzierten die Expression von mehr als 30% der ribosomalen Proteine der 50S Untereinheit bei *P. multocida* (Tab. 8). Die zehnfache MHK dieser Antibiotika hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die Expression der entsprechenden Zielgene (Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008).

Tabelle 8. Regulation der Expression der Antibiotika *targets* bei *P. multocida*.

Antibiotika	Zielgen(e)	Regulation
Novobiocin	<i>gyrAB</i>	Induktion
Enrofloxacin	<i>gyrAB</i>	Keine
Florfenicol	<i>rpl</i> (11 von 32)	Induktion
Tilmicosin	<i>rpl</i> (11 von 32)	Induktion
Trimethoprim	<i>folAB</i>	Keine
Brodimoprim	<i>folAB</i>	Keine
Rifampicin	<i>rpoBC</i>	Induktion
Cefquinom	<i>ponABC, dacAB, pbp2, ftsI</i>	Keine

Dargestellt ist die Richtung der Expressionsänderung nach der Inkubation mit der einfachen MHK des jeweiligen Antibiotikums für 10 min bzw. 30 min im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen.

Die restlichen vier Antibiotika des Referenzkompendiums zeigten keine Auswirkung auf die Expression der entsprechenden Zielgene. Die sieben Transpeptidase Penicillin Bindungsproteine wurden während der Inkubation mit Cefquinom unverändert exprimiert (Tab. 8). Genauso blieb die Transkription der Folatdehydrogenase nach Zugabe von beiden Inhibitoren der Folatbiosynthese, Trimethoprim und Brodimoprim, unverändert. Auch eine Konzentrationserhöhung dieser drei Antibiotika bewirkte keine Veränderung der Transkription der Zielgene (Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008). Die DNA Gyrase wurde durch die einfachen MHK von Enrofloxacin ebenfalls nicht beeinflusst. Allerdings erfolgte bei zehnfacher MHK eine Induktion der β -Untereinheit des Enzyms (Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008).

3.1.6 Regulation von Signaturgenen in *P. multocida* durch die Antibiotika des Referenzkompendiums

Ferner wurden Signaturgene, also Gene, die für jedes einzelne Antibiotikum spezifisch zu beiden Inkubationszeitpunkten reguliert waren, identifiziert. Die Bestimmung solcher Signaturgene ist hilfreich bei einer Einordnung von Antibiotika mit unbekanntem MoA (Gmuender *et al.*, 2001, Hutter *et al.*, 2004, Freiberg *et al.*, 2006). Aus Tabelle 9 lässt sich die Anzahl der spezifisch regulierten Gene (Tab. A5) ablesen. Novobiocin und Rifampicin wiesen den größten Anteil an spezifisch regulierten Genen mit 17 % bzw. 8 % der insgesamt regulierten Gene auf (Tab. 9). Der Prozentsatz der Signaturgene an den insgesamt regulierten Genen lag bei den restlichen sechs Antibiotika zwischen 0 und 2 % (Tab. 9). Im Folgenden wird auf einige bezeichnende Signaturgene detaillierter eingegangen.

Tabelle 9. Übersicht über die Anzahl der differentiell exprimierten Gene und die Signaturgene von *P. multocida*.

Antibiotikum	Anzahl der regulierter Gene		Signaturgene
	insgesamt	AB spezifisch	
Novobiocin	944	158 (17 %) *	ABC-type Transporter ↓↑**, <i>gyrAB</i> ↑, PM0469-0476 ↓
Enrofloxacin	59	1 (2 %)	<i>recA</i> ↑, <i>impA</i> ↑
Florfenicol	601	4 (1 %)	PM1129 ↑, <i>rpl</i> ↑
Tilmicosin	706	12 (2 %)	PM0836 ↑, <i>rpl</i> ↑
Trimethoprim	390	3 (1 %)	PM1190 ↑
Brodimoprim	316	1 (0,3 %)	PM1127 ↑
Rifampicin	670	52 (8 %)	PM1679-1682 ↑, <i>wza</i> ↑
Cefquinom	77	0 (0 %)	Kein Gen gefunden

* In Klammern der Prozentanteil an insgesamt regulierten Genen (1xMHK, 10 min und 30 min). ** ↑-Induktion der Expression, ↓-Repression der Expression.

Novobiocin zeigte die größte Anzahl an spezifisch regulierten *P. multocida* Genen. Darunter waren auch *gyrA* und *gyrB*, welche für das Zielprotein von Novobiocin, die DNA Gyrase, kodieren (Tab. 10, 11). Dieses prägnante Merkmal wies nur Novobiocin auf. Kein weiteres Antibiotikum hatte das Zielgen unter den Signaturgenen. Außerdem wurde der Wirkmechanismus von Novobiocin, die Inhibierung der ATPase Funktion der DNA Gyrase (Lewis *et al.*, 1996), durch die Transkriptionsreprimierung von 35 und die Induzierung von 22 ATPase kodierenden Genen verdeutlicht. Die meisten dieser ATPasen kodieren für ABC-Transporter, welche in der Aufnahme von Nährstoffen, Vitaminen und Ionen involviert sind. Die Regulation vieler ATPasen war spezifisch für die Novobiocin-induzierten Expressionsprofile (Signaturprofil). Weiterhin regulierte Novobiocin spezifisch eine Region bestehend aus sieben Genen (PM0469-PM0476). Drei Gene dieser Region kodieren für einen putativen periplasmatischen Transport-Komplex vom ABC-Type (PM0470-PM0471). PM0473 kodiert für einen potentiellen TRAP-Transporter. Obwohl nicht alle dieser Gene ausschließlich durch Novobiocin reguliert wurden, waren der frühe Zeitpunkt der Regulation (bereits nach 10 min Inkubation) und die Tatsache, dass es sich hierbei um eine Repression handelte, spezifisch für Novobiocin.

Das Gen *impA* wurde exklusiv durch Enrofloxacin induziert. Dieses Gen kodiert für einen Repressor, der in der DNA-Reparatur involviert ist. Das DNA-Reparatursystem, auch SOS-Antwort genannt, wird bei der Entstehung von *single strand* DNA-Brüchen eingeschaltet, die durch die Inhibierung der DNA Gyrase durch Enrofloxacin entstehen (Walsh, 2002). Die Transkription von neun weiteren Genen, die für an der SOS-Antwort beteiligte Proteine wie den

LexA Repressor, den RecX Regulator und RecA kodieren, wurde spezifisch durch Enrofloxacin induziert. Die Transkription von *recA* stieg bereits nach 10 min Inkubation mit Enrofloxacin auf mehr als das Doppelte. Aus diesem Grund konnte *recA* nicht für die *real-time* PCR-Normalisierung der Enrofloxacin Experimente eingesetzt werden. Mit Ausnahme von Florfenicol, das nach 30 min zu einer geringen (1,5-fach) Induktion der *recA* Transkription führte, beeinflusste kein weiteres Antibiotikum die *recA* Transkription. Daher wurde *recA* als ein Signaturgen des Enrofloxacin-Transkriptionsprofils gewertet (Tab. 9).

In der Tab. 9 sind die wenigen Signaturgene der Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin aufgeführt. Zusätzlich wurde die Expressionsinduktion der Gene, welche für die ribosomalen Proteine kodieren, als charakteristisch für den MoA beider Antibiotika ermittelt. Dabei induzierte Florfenicol 16 ribosomale Gene (von 54 auf dem *microarray*) und Tilmicosin induzierte 14 und reprimierte nur 1 ribosomales Gen (Tab. 8, Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008). Von allen Antibiotika des Referenzkompendiums hatte Rifampicin als einziges einen vergleichbaren Einfluss auf die Transkription der ribosomalen Gene, wobei im Gegensatz zu Florfenicol und Tilmicosin die meisten (9) von den 15 regulierten ribosomalen Genen durch Rifampicin reprimiert wurden.

Die Folatbiosynthese Inhibitoren Trimethoprim und Brodimoprim unterscheiden sich strukturell nur in einem Substituenten am Benzol-Ring (Tab. 3). Für Trimethoprim wurden drei Signaturgene identifiziert, von denen zwei für hypothetische Proteine PM1190 und PM1798 kodieren, und ein Gen für eine Acetylerase (PM1451) (Tab. 9). Dagegen wurde für Brodimoprim nur ein Signaturgen ermittelt, welches für das hypothetische Protein PM1127 kodiert (Tab. 9).

Bei Rifampicin wurden 52 Signaturgene ermittelt. Die meisten davon wurden induziert und kodieren für hypothetische Proteine, wie z.B. das putative Operon PM1679-1682. PM1680 ist homolog zu *tctB* und PM1861 homolog zu *tctA*, welche in dem Transport von Tricarboxylaten involviert sind. PM1682 ist ein homologes Protein zu AslA, einer Arylsulphatase von *E. coli* (Hoffman *et al.*, 2000). Ein weiteres Signaturgen für Rifampicin war PM1016, das für ein Kapsel-Transportprotein kodiert. Für Cefquinom konnten keine Signaturgene identifiziert werden.

3.1.7 Regulation von Stressfaktoren in *P. multocida* durch die Antibiotika des Referenzkompendiums

Im nächsten Schritt der Expressionsprofiling Analyse wurden Gene ermittelt, die durch Antibiotika mit mindestens drei unterschiedlichen Wirkmechanismen reguliert wurden (Tab. A6, im Anhang). Hier war die Identifizierung von Zellprozessen, die durch viele Antibiotika beeinflusst wurden (Stressfaktoren), Ziel der Analyse. Die so identifizierten Gene (97) wurden als allgemeine Stressfaktoren definiert und gehörten zu unterschiedlichen funktionellen Gruppen (Abb. 19).

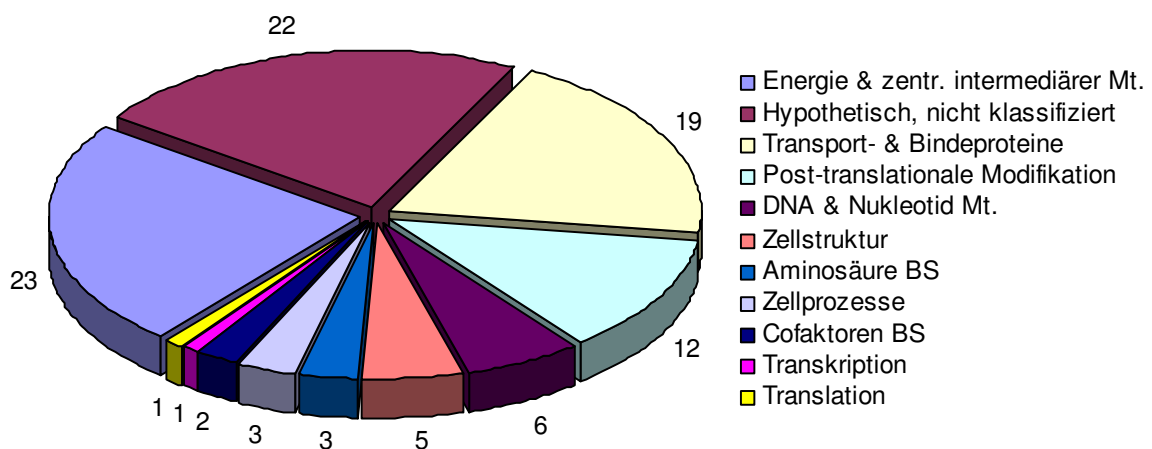


Abb. 19. Funktionelle Einteilung der allgemeinen Stressfaktoren von *P. multocida*.

Die Analyse der Stressfaktoren zeigte, dass in erster Linie die Gene beeinflusst wurden, die für Proteine mit Funktionen im Energie- & zentralen intermediären Metabolismus kodierten (insgesamt 23 Gene). Das war die Mehrheit der durch Stressfaktoren betroffenen Gene (23). An zweiter Stelle waren die hypothetischen Proteine (21 Gene), gefolgt von der Transport- & Bindeproteingruppe mit 19 identifizierten Stressfaktoren. Die meisten Gene aus diesen drei Gruppen wurden durch die Inkubation mit Antibiotika reprimiert. In der post-translationalen Modifikationsgruppe wurden zwölf Gene reguliert, sechs davon kodieren für Chaperone. Weiterhin wurden zwei von diesen sechs Chaperonen, *groES* (PM1106) und *htpG* (PM1024), durch alle Antibiotika des Referenzkompendiums reguliert. Die verbliebenen 21 Stressfaktoren wurden in sieben weitere funktionelle Gruppen eingeteilt.

3.1.8 Vergleich der Transkriptomregulation von *M. haemolytica* und *P. multocida*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für *M. haemolytica* ebenfalls ein Referenzkompendium unter Verwendung der gleichen acht Antibiotika wie für *P. multocida* erstellt. Um ein Verständnis für die Spezies-spezifischen Unterschiede der Transkriptionsprofile zu erhalten, wurden die Referenzkompendien beider Bakterien miteinander verglichen.

Durch die einfache MHK der acht Antibiotika des Referenzkompendiums wurde in *M. haemolytica* die Transkription von weniger Genen beeinflusst als in *P. multocida*. Insgesamt wurden 42 % (1079 Gene) des *Mannheimia* Genoms transkriptionell reguliert, was einen deutlichen Unterschied zu den 70 % (1468 Gene) bei *P. multocida* zeigt. Darüber hinaus konnten die Transkriptionsprofile der bakterizid wirkenden Antibiotika von den bakteriostatisch wirkenden Antibiotika in *M. haemolytica* nicht voneinander unterschieden werden, wie das der Fall in *P. multocida* war (Tab. 7 und 10).

Bei einfacher MHK nach 10 min beeinflussten Florfenicol, Tilmicosin und Novobiocin, mit jeweils 13 %, 9 % und 10 %, die meisten *M. haemolytica* Gene (Tab. 10). Diese Antibiotika bewirkten auch bei *P. multocida* die stärksten globalen transkriptionalen Veränderungen (Tab. 7). Allerdings hatte Novobiocin mit 40 % (Tab. 7) aller *P. multocida* Gene und Tilmicosin mit 20 % einen mehr als doppelt so großen Effekt auf das Transkriptom wie in *M. haemolytica*, während die Veränderungen durch Florfenicol im gleichen Bereich wie bei *P. multocida*, 19 % (Tab. 7) lagen. Die fünf anderen Antibiotika des Referenzkompendiums änderten die Transkription von deutlich unter 10 % aller *M. haemolytica* Gene (Tab. 10). Die Folatbiosynthese Inhibitoren hatten mit 2,0 % (Trimethoprim) und 0,7 % (Brodimoprim) aller *M. haemolytica* Gene deutlich weniger Auswirkung auf die globale Transkription als in *P. multocida* (16,8 % und 11,6 %). Analog dazu wurde von Rifampicin in *M. haemolytica* die Transkription von nur 1,3 % aller Gene verändert im Gegensatz zu 18,3 % bei *P. multocida*. Dagegen beeinflussten die beiden bakterizid wirkenden Antibiotika Cefquinom und Enrofloxacin die Transkription von 1,3 % und 0,5 % aller Gene in *M. haemolytica*, welches ähnlich in *P. multocida* war (1,0 % und 0,4 %, Tab. 7 und 10).

Tabelle 10. Anzahl der regulierten *M. haemolytica* Gene nach Inkubation mit den Antibiotika des Referenzkompendiums.

Antibiotikum	Konzentration, Inkubationszeit	Differenziell exprimierte Gene			
		Induziert	Reprimiert	Gesamt	% Genome
Novobiocin	1xMHK, 10min	91	161	252	9,89
	1xMHK, 30min	38	100	138	5,42
	10xMHK, 10min	422	743	1165	45,74
Enrofloxacin	1xMHK, 10min	14	-	14	0,55
	1xMHK, 30min	23	11	34	1,33
	10xMHK, 10min	38	21	59	2,32
Florfenicol	1xMHK, 10min	129	207	336	13,19
	1xMHK, 30min	256	310	566	22,22
Tilmicosin	1xMHK, 10min	64	164	228	8,95
	1xMHK, 30min	188	258	446	17,51
	10xMHK, 10min	267	397	664	26,07
Trimethoprim	1xMHK, 10min	25	28	53	2,08
	1xMHK, 30min	80	42	122	4,79
	10xMHK, 10min	242	238	480	18,85
Brodimoprim	1xMHK, 10min	7	11	18	0,71
	1xMHK, 30min	14	16	30	1,18
	10xMHK, 10min	88	191	279	10,95
Cefquinom	1xMHK, 10min	16	18	34	1,33
	1xMHK, 30min	27	11	38	1,49
	10xMHK, 10min	50	9	59	2,32
Rifampicin	1xMHK, 10min	28	5	33	1,30
	1xMHK, 30min	53	23	76	2,98
	10xMHK, 10min	216	174	390	15,31

Bei verlängerter Inkubationsdauer (30 min) stieg die Anzahl der differenziell exprimierten Gene in *M. haemolytica* bei allen Antibiotika des Referenzkompendiums, außer bei Novobiocin, bei dem die Anzahl der differenziell exprimierten Gene im zeitlichen Verlauf abnahm. In *P. multocida* stieg die Anzahl der regulierten Gene bei 30 min Inkubation bei allen Antibiotika, einschließlich Novobiocin (Tab. 7).

Die zehnfache MHK der Antibiotika des Referenzkompendiums bewirkte in *M. haemolytica* einen viel stärkeren Effekt auf die Regulation des Transkriptoms als in *P. multocida* (Tab. 7 und 10, Abb. 20). Insgesamt 36 % aller *M. haemolytica* Gene wurden zusätzlich zu den bei 1xMHK regulierten Genen

durch die zehnfache MHK der Antibiotika differentiell exprimiert. In *P. multocida* lag diese Steigerung lediglich bei 7 %. Alles in allem wurden bei der zehnfachen MHK 78 % des *M. haemolytica* Genoms reguliert (82 % *P. multocida* Genoms). Der größte dosisabhängige Effekt wurde bei Novobiocin festgestellt (Tab. 7, Abb. 20). Bei diesem Antibiotikum wurden 4,5-fach mehr Gene durch die zehnfache MHK differentiell transkribiert als durch die Verwendung der einfachen MHK. In *P. multocida* hatte Novobiocin dagegen kaum einen dosisabhängigen Effekt (1,07-fach mehr Gene bei 10xMHK, Abb. 16).

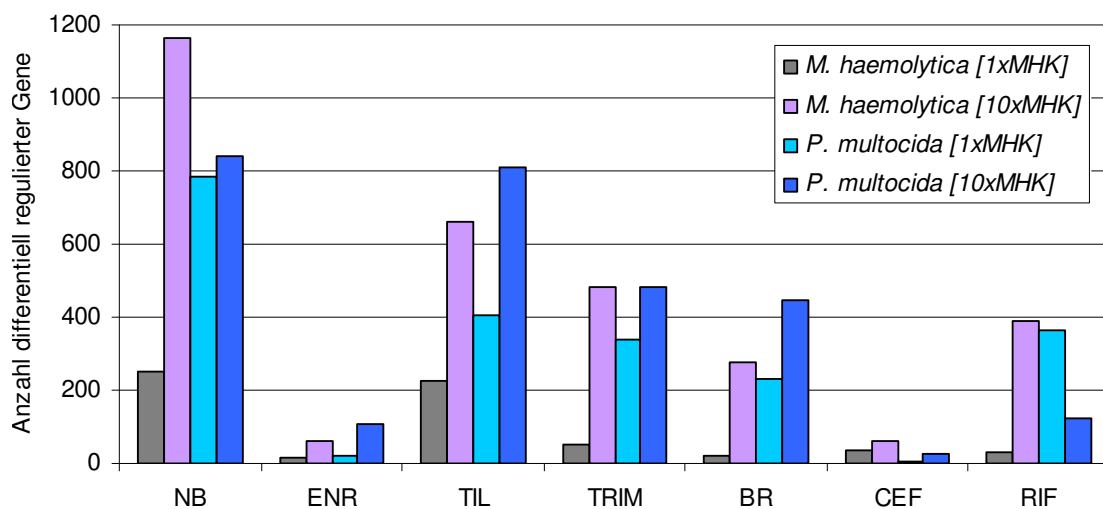


Abb. 20. Anzahl der differentiell exprimierten *M. haemolytica* und *P. multocida* Gene in Gegenwart der einfachen bzw. zehnfachen MHK der Antibiotika des Referenzkompendiums. Die Bakterien wurden 10 min mit den verschiedenen Antibiotika bei 1xMHK bzw. 10xMHK inkubiert. NB: Novobiocin, ENR: Enrofloxacin, TIL: Tilmicosin, TRM: Trimethoprim, BR: Brodimoprim, CEF: Cefquinom, RIF: Rifampicin.

Die *cluster*-Analyse der Transkriptionsprofile bei einfacher MHK von *M. haemolytica* (Abb. 21) zeigte einige wenige Übereinstimmungen mit der von *P. multocida* (Abb. 17). Wie bei *P. multocida* wurden mit Ausnahme von den Tilmicosin regulierten Expressionsprofilen beide Zeitpunkte (10 min und 30 min) eines Antibiotikums zusammen gruppiert (Abb. 21). Eine weitere Ähnlichkeit war die Trennung der Expressionsprofile von der DNA-Topoisomerase-Inhibitoren Novobiocin und Enrofloxacin. Im Unterschied zu *P. multocida* bildeten die Brodimoprim-induzierten Expressionsprofile kein gemeinsames *cluster* mit dem anderen Inhibitor der Folatbiosynthese, Trimethoprim. Brodimoprim bildete ein separates *cluster*, während die Trimethoprim-induzierten Expressionsprofile in eine Gruppe mit denen von Rifampicin und Cefquinom eingeordnet wurden (Abb. 21). Auch bildeten die beiden Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin keine gemeinsame Gruppe und wichen damit von den Resultaten in *P. multocida* deutlich ab

(Abb. 17). Alle vier Expressionsprofile, einschließlich der 10 min Tilmicosin, wurden jedoch sehr nah bei einander gruppiert, was auf eine gewisse Ähnlichkeit der Profile hinweist (Abb. 21).

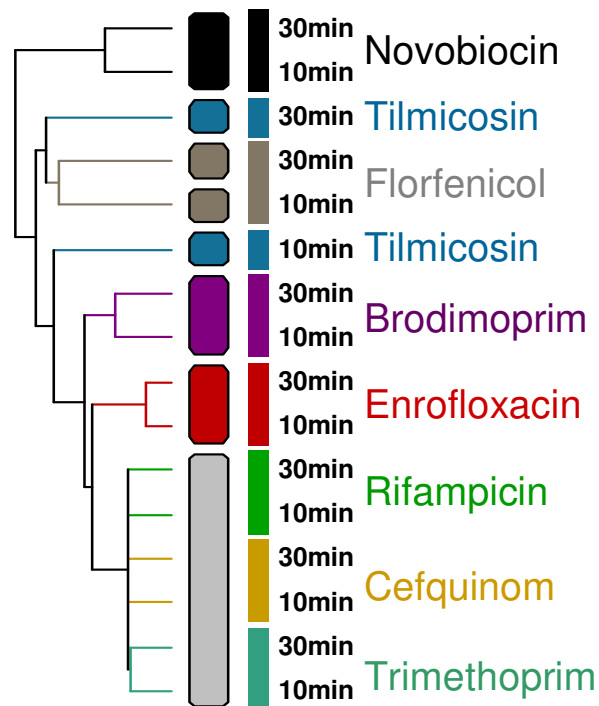


Abb. 21. Hierarchische Cluster Analyse der Antibiotika-induzierten Expressionsprofile von *M. haemolytica*.

Zur Einteilung der regulierten Gene in funktionelle Gruppen (*fingerprint*-Analyse) wurden bei *M. haemolytica* entsprechend zu *P. multocida* nur die Gene berücksichtigt, deren Transkription nach 10 min Inkubation mit der einfachen MHK der einzelnen Antibiotika beeinflusst wurde (Abb. A2). Ähnlich zu *P. multocida* wurden bei *M. haemolytica* drei funktionelle Gruppen durch fast alle Antibiotika beeinflusst. Hierzu zählten die regulatorischen Funktionen, die DNA- & Nukleotidmetabolismus- und die Transport- & Bindeproteine Gruppe.

Die funktionelle Einordnung der durch Transkriptionenhibitoren Florfenicol und Tilmicosin regulierten *M. haemolytica* Gene ergab den gleichen *fingerprint* wie bei *P. multocida* (Abb. 22). Während die meisten Gene der Translationsgruppe überexprimiert waren (28% durch Florfenicol, 16% durch Tilmicosin), waren die Gene der post-translationalen Modifikation Gruppe ausschließlich reprimiert (17% durch Florfenicol, 12% durch Tilmicosin) (Abb. 22).

Außerdem ergab die *fingerprint*-Analyse bei *P. multocida* und *M. haemolytica* eine für DNA Gyrase Inhibitoren Novobiocin und Enrofloxacin kennzeichnende Regulation der DNA- & Nukleotid Metabolismus Gruppe (Abb. 22).

Ansonsten, ähnlich wie bei *P. multocida*, unterschieden sich die Expressionsprofile dieser beiden Antibiotika in *M. haemolytica* stark voneinander. Dabei wurde von Novobiocin die Gruppe der Proteinmodifikation am stärksten beeinflusst (18%), gefolgt von der Aminosäure Biosynthese- (14%) und DNA & Nukleotid Metabolismus-Gruppe (11%). Durch Enrofloxacin wurde bei *M. haemolytica* die DNA- & Nukleotidmetabolismus-Gruppe am stärksten reguliert (4%), gefolgt von der Transkriptionsgruppe (3%) (Abb. 22).

Die *fingerprints* der restlichen vier Antibiotika des Referenzkompendiums von *M. haemolytica* unterschieden sich von den *P. multocida fingerprints* derselben Antibiotika (Tab. 11). In *P. multocida* wurden durch Rifampicin und durch beide Folatbiosynthese Inhibitoren, Trimethoprim und Brodimoprim, Gene aus allen 14 funktionellen Gruppen, beeinflusst. In *M. haemolytica* regulierte Rifampicin Gene in 10 funktionellen Gruppen, wobei die Transkriptionsgruppe, d.h. die funktionelle Gruppe des Zielproteins, nicht beeinflusst wurde (Tab. 11). Am stärksten wurde die Proteinmodifikation- & Abbau Gruppe reguliert (7 % induziert). Durch Brodimoprim in *M. haemolytica* konnte in 7 unterschiedlichen funktionellen Gruppen keine Regulation beobachtet werden, bei Trimethoprim traf dies nur für die Transkriptionsgruppe zu. Die Cofaktoren Biosynthese Gruppe, welche das Fola Zielprotein enthält, wurde durch beide Antibiotika bei *M. haemolytica* ähnlich stark beeinflusst, bei *P. multocida* jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Tab. 11).

Cefquinom hat sich in *M. haemolytica* auf Gene aus 10 funktionellen Gruppen ausgewirkt, in *P. multocida* nur aus 4 Gruppen. In beiden Bakterien wurde die Expression von keinem Gen in der Zellstruktur Gruppe (enthält die Transpeptidasen Zielproteine) verändert (Tab. 11).

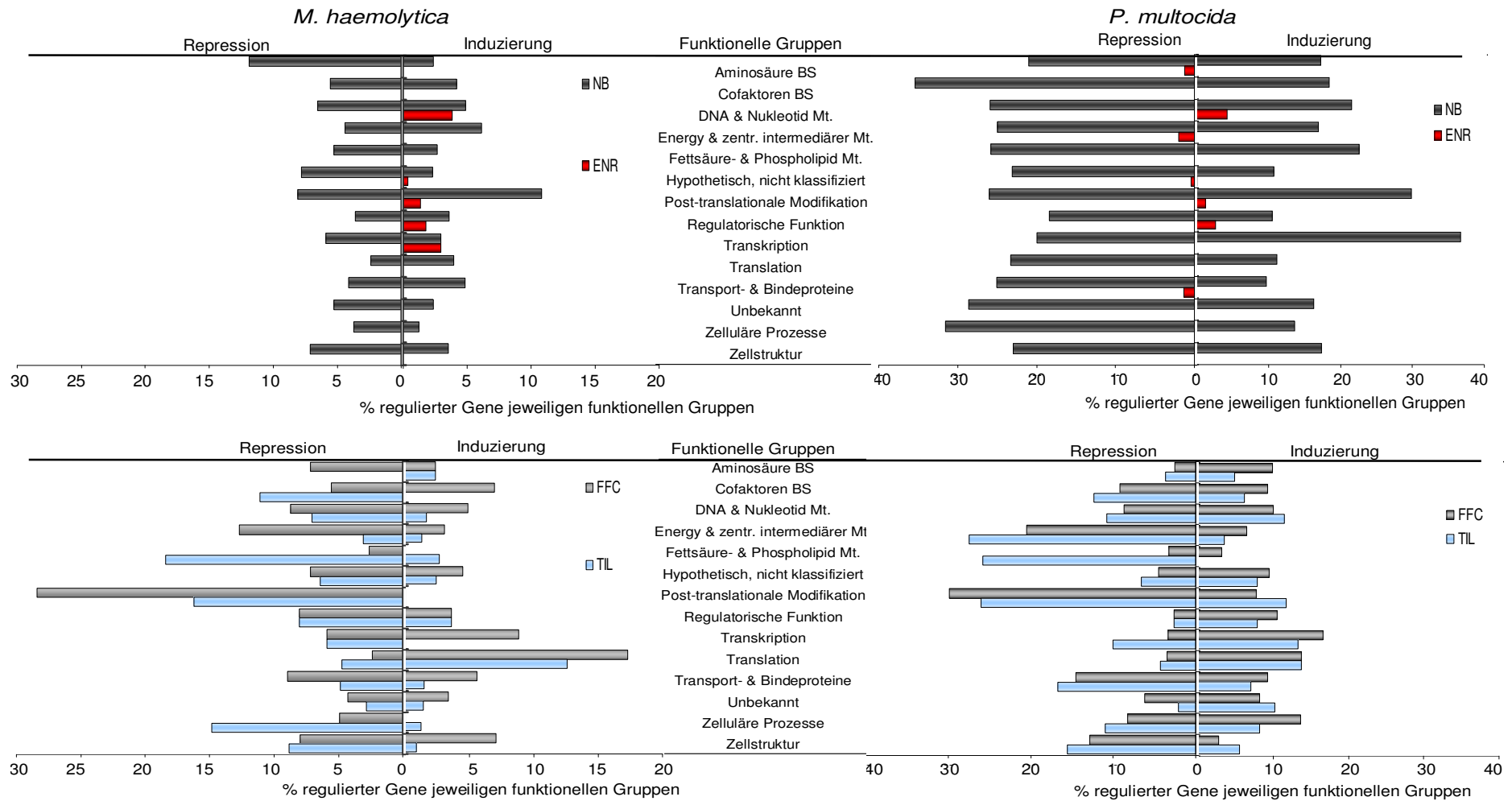


Abb. 22. Einteilung der regulierten Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida* in funktionelle Gruppen. Die Abszisse zeigt den Anteil regulierter Gene pro funktionelle Gruppe in %. Mt.-Metabolismus, NB: Novobiocin, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, TIL: Tilmicosin.

Tabelle 11. *P. multocida* bzw. *M. haemolytica* spezifische fingerprints.

Funktionelle Gruppen	<i>P. multocida</i>					<i>M. haemolytica</i>				
	Gesamt Gene	Trimethoprim % Ind.*	Brodimoprim % Repr.*	Trimethoprim % Ind.	Brodimoprim % Repr.	Gesamt Gene	Trimethoprim % Ind.	Brodimoprim % Repr.	Trimethoprim % Ind.	Brodimoprim % Repr.
Aminosäure BS	81	8,6	3,7	1,2	2,5	84	1,2	-	-	-
Cofaktoren BS	65	4,6	15,4	3,1	4,6	72	1,4	1,4	1,4	2,8
DNA & Nukleotid Mt.	139	5,8	9,4	5,0	2,9	184	1,1	-	-	0,5
Energie & zentr. intermediärer Mt.	200	5,5	12,5	4,0	17,5	228	1,3	5,3	0,4	-
Fettsäure- & Phospholipid Mt.	31	6,5	9,7	12,9	-	38	-	2,6	-	-
Hypothetisch, nicht klassifiziert	727	11,0	3,3	7,2	2,2	922	1,4	0,5	0,5	0,4
Post-translationale Modifikation	77	6,5	28,6	9,1	16,9	74	-	1,4	-	-
Regulatorische Funktion	76	5,3	3,9	3,9	2,6	112	-	1,8	-	-
Transkription	30	3,3	10,0	6,7	-	34	-	-	-	2,9
Translation	116	4,3	6,9	1,7	0,9	127	0,8	0,8	-	-
Transport- & Bindeproteine	227	8,8	13,7	7,0	11,9	268	0,4	0,7	-	0,4
Unbekannt	49	8,2	-	4,1	-	210	0,5	-	-	1,0
Zellprozesse	73	4,1	17,8	5,5	5,5	81	1,2	-	-	-
Zellstruktur	109	4,6	13,8	2,8	8,3	113	-	1,8	-	-

Funktionelle Gruppen	<i>P. multocida</i>					<i>M. haemolytica</i>				
	Gesamt Gene	Rifampicin % Ind.	Cefquinom % Repr.	Rifampicin % Ind.	Cefquinom % Repr.	Gesamt Gene	Rifampicin % Ind.	Cefquinom % Repr.	Rifampicin % Ind.	Cefquinom % Repr.
Aminosäure BS	81	19,8	2,5	-	-	84	1,2	-	-	-
Cofaktoren BS	65	7,7	7,7	1,5	-	72	1,4	-	-	1,4
DNA & Nukleotid Mt.	139	9,4	3,6	-	-	184	0,5	-	1,6	0,5
Energie & zentr. intermediärer Mt.	200	12,0	17,0	-	1,0	228	0,9	0,4	-	1,3
Fettsäure- & Phospholipid Mt.	31	3,2	3,2	-	-	38	-	-	-	-
Hypothetisch, nicht klassifiziert	727	14,7	3,2	-	0,1	922	1,2	0,1	0,8	0,4
Post-translationale Modifikation	77	13,0	9,1	-	1,3	74	6,8	-	6,8	-
Regulatorische Funktion	76	7,9	-	-	-	112	2,7	-	-	0,9
Transkription	30	13,3	13,3	-	-	34	-	-	-	2,9
Translation	116	3,4	12,1	-	-	127	-	-	-	0,8
Transport- & Bindeproteine	227	8,8	10,6	-	0,9	268	0,4	1,1	-	1,9
Unbekannt	49	8,2	8,2	-	-	210	1,0	-	0,5	-
Zellprozesse	73	6,8	5,5	-	-	81	-	-	-	-
Zellstruktur	109	11,9	3,7	-	-	113	0,9	-	-	-

Die regulierten Gene nach 10-minütiger Inkubation mit 1xMHK einzelnen Antibiotika wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt. * % Prozentueller Anteil der Gesamtgene der entsprechenden funktionellen Gruppe, der induziert (Ind.) bzw. reprimiert (Repr.) war.

Nur drei Antibiotika beeinflussten in *M. haemolytica* die Expression ihrer jeweiligen Zielgene, alle anderen zeigten darauf keinen Einfluss (Tab. 12). Novobiocin induzierte die Transkription der beiden DNA Gyrase Untereinheiten und Florfenicol und Tilmicosin induzierten mehr als 30% der ribosomalen Gene. Dieses Ergebnis entspricht dem bei *P. multocida* (Tab. 8 und 12). Rifampicin bildete eine Ausnahme. Die Transkription der RNA-Polymerase in *M. haemolytica* wurde erst durch die zehnfache MHK von Rifampicin beeinflusst (1,6-fache Induktion, in *P. multocida* 1,6-fache Induktion bereits nach 10 min Inkubation mit 1xMHK). Das war der einzige dosisabhängige Effekt auf die Transkription der Zielgene in *M. haemolytica*. Die höhere Konzentration aller anderen Antibiotika zeigte keine zusätzliche Wirkung in *M. haemolytica* auf die entsprechenden Zielgene. Dieses Ergebnis wurde auch in *P. multocida* beobachtet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendeten Antibiotika die Transkription ihrer Zielproteine nicht *per definitionem* beeinflussten.

Tabelle 12. Regulation der Expression der Antibiotika *targets* bei *M. haemolytica*.

Antibiotika	Zielgen	Regulation	
		<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>
Novobiocin	<i>gyrAB</i>	Induktion	Induktion
Enrofloxacin	<i>gyrAB</i>	Keine	Keine
Florfenicol	<i>rpl</i> (14 von 32)	Induktion	Induktion
Tilmicosin	<i>rpl</i> (10 von 32)	Induktion	Induktion
Trimethoprim	<i>folAB</i>	Keine	Keine
Brodimoprim	<i>folAB</i>	Keine	Keine
Rifampicin	<i>rpoBC</i>	Keine	Induktion
Cefquinom	<i>ponABC, dacAB, pbp2, ftsI</i>	Keine	Keine

Dargestellt ist die Art der Expressionsänderung nach der Inkubation mit der 1xMHK des jeweiligen Antibiotikums im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Ähnlich wie bei *P. multocida* gehörten in *M. haemolytica* ABC-Transporter zu den Signaturgenen von Novobiocin (Tab 13, Tab. A7). Die DNA Gyrase zählte bei *P. multocida* zu den Signaturgenen von Novobiocin. In *M. haemolytica* wurde die Transkription der *gyrAB* durch Novobiocin nur zum frühen Zeitpunkt (nach 10 min Inkubation) induziert, was die DNA Gyrase als Signaturgen disqualifizierte, da die Signaturgene auch zum späten Zeitpunkt reguliert werden müssen. Zu den Signaturgenen von Florfenicol und Tilmicosin gehörten bei *M. haemolytica* ebenso wie bei *P. multocida*, die Gene, die für ribosomale Proteine und für die Proteine, die in der Transkription beteiligt sind, ko-

dieren. Bei beiden Bakterien wurden keine Signaturgene für Cefquinom gefunden (Tab. 9 und 13).

Tabelle 13. Tabellarische Übersicht über die Anzahl der differentiell exprimierten Gene und die Signaturgene bei *M. haemolytica*.

Antibiotikum	Anzahl der regulierter Gene insgesamt	Signaturgene	Beispiele für Signaturgene
Novobiocin	294	44 (15 %)	ABC-Transporter↑↓**
Enrofloxacin	36	8 (22 %)	SOS Antwort↑ (<i>recN</i> , <i>uvrD</i> , <i>recA</i> , <i>recX</i> , <i>mh2287-mh2288</i>)
Florfenicol	645	65 (10 %)	Ribosomale Gene↑ (<i>rpL7</i> , <i>15</i> , <i>16</i> ; <i>rpS17</i>)
Tilmicosin	586	28 (5 %)	Ribosomales Gen↑ (<i>rpL5</i>)
Trimethoprim	140	6 (4 %)	<i>folD</i> ↑
Brodimoprim	37	2 (5 %)	<i>mh2216</i> ↑, <i>mh2295</i> ↑
Rifampicin	99	4 (4 %)	<i>gcvA</i> ↑
Cefquinom	67	0 (0 %)	-

In Klammern: Anteil an insgesamt regulierten Genen (1xMHK, 10min und 30 min). ** ↑-Induktion der Expression, ↓-Repression der Expression.

Zu den Signaturgenen von Enrofloxacin bei *M. haemolytica* gehörten die DNA-Metabolismus Gene *uvrD*, *recA* und *recN* sowie das Gen *recX*, welches für ein regulatorisches Protein der SOS Antwort kodiert (Tab. 13, Tab. A7). Das war abweichend von den Enrofloxacin-Signaturgenen bei *P. multocida*, bei dem nur zwei Gene, *recA* und *impA* als Signaturgene identifiziert wurden (Tab. 9). Außerdem wurden im Gegensatz zu *P. multocida* (52 Rifampicin-Signaturgenen) bei *M. haemolytica* nur vier Rifampicin-Signaturgene identifiziert (Tab. 9 und 13). Eins davon, MH2548 und sein orthologes Gen PM0567, wurde bei beiden Bakterien zu den Rifampicin-Signaturgenen gezählt. Dieses Gen kodierte für den Transkriptions-Aktivator GcvA, der 2,5-fach in *M. haemolytica* und 2-fach in *P. multocida* in Gegenwart von Rifampicin bei 10 und 30 min induziert exprimiert wurde. Drei weitere Signaturgene kodierten für hypothetische Proteine ohne Orthologe in der *P. multocida* Signaturgenengruppe. Für Trimethoprim und Brodimoprim wurden bei beiden Erregern nur wenige Signaturgene identifiziert (Tab. 9 und 13). Bei *M. haemolytica* wurde für Trimethoprim *folD*, ein Gen aus der Folatbiosynthese, und für Brodimoprim zwei für hypothetische Proteine kodierende Gene, MH2216 und MH2295, als Signaturgene gefunden. Bei *P. multocida* hingegen galt dies bei beiden Substanzen jeweils nur für ein hypothetisches Gen, das jeweils kein orthologes Gen bei *M. haemolytica* hatte (Tab. 9).

Bemerkenswert war, dass insgesamt nur sechs Gene als allgemeine Stressfaktoren in *M. haemolytica* identifiziert wurden und keines davon durch alle Antibiotika reguliert wurde. Bei *P. multocida* wurden im Gegensatz dazu

92 Stressfaktoren reguliert und zwei davon wurden durch alle Antibiotika beeinflusst (Abb. 20). Drei *M. haemolytica stress response* Gene kodierten für hypothetische Proteine, die restlichen drei kodierten für typische Stress-assoziierte Proteine, die Chaperone DnaJ und ClpB und das Proteasom HslV.

3.2 Einfluss der Antibiotika des Referenzkompendiums auf die Transkription von Virulenzgenen

Virulenzfaktoren spielen bei der Manifestation einer Erkrankung im Wirt eine essentielle Rolle (Wassenaar & Gaastra, 2001). Sowohl *M. haemolytica* als auch *P. multocida* weisen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren auf (May *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2004a,b; Zecchinon *et al.*, 2005). So lassen sich mit Hilfe der Literatur und eigener Recherche 165 *P. multocida* Gene, sowie 212 *M. haemolytica* Gene, als potentielle Virulenzfaktoren einordnen (May *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2004a,b; Zecchinon *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2006). Um die Auswirkung der unterschiedlichen Antibiotika des Referenzkompendiums auf die Transkription der Virulenzgene in beiden Erregern zu untersuchen, wurde die differentielle Expression dieser Gene nach der Antibiotika Gabe analysiert. Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse für *P. multocida* und anschließend die für *M. haemolytica* präsentiert.

3.2.1 Virulenzgen Regulation bei *P. multocida*

Die Transkription von 73 der 165 Virulenz-assoziierten *P. multocida* Gene wurde nach der Zugabe für 10 min und 30 min der einfachen MHK verschiedener Antibiotika des Referenzkompendiums reguliert (Abb. 23). Novobiocin, gefolgt von Tilmicosin und bei längerer Inkubationszeit auch Florfenicol, beeinflussten die Transkription der meisten Virulenzfaktoren (Tab. 14). Die Folatebiosynthese Inhibitoren Trimethoprim und Brodimoprim veränderten die Transkription von mittelmäßig vielen Genen (nach 10 min Inkubation von 30 bzw. 17 Virulenzgenen und nach 30 min Inkubation die von 23 bzw. 19 Virulenzgenen, Tab. 14). Ähnlich hatte Rifampicin eine Auswirkung auf die Transkription von 24 Virulenzgenen nach 10 min, bzw. 23 Virulenzgenen nach 30 min Inkubation. Im Gegensatz dazu, wurde die Expression nur weniger Virulenzgene von Enrofloxacin und Cefquinom beeinflusst (Tab. 14, Abb. 23).

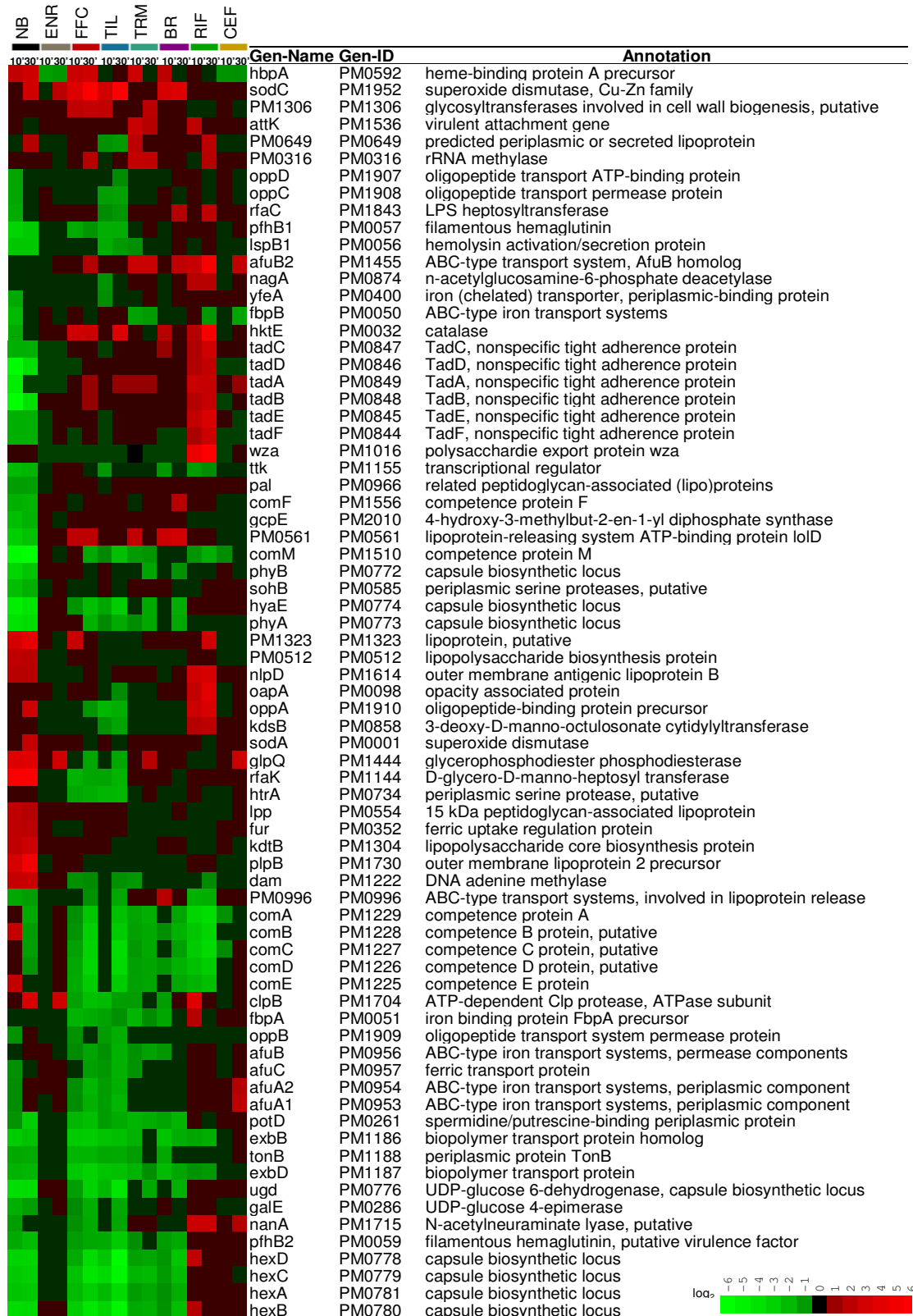


Abb. 23. Regulation potentieller Virulenzfaktoren in *P. multocida* durch die Antibiotika des Referenzkompendiums. Die Inkubationszeit mit 1xMHK betrug 10 min und 30 min. Die Farben kodieren für die Richtung der Regulation (Grün = Reprimierung, Rot = Induktion). NB-Novobiocin, ENR-Enrofloxacin, FFC-Florfenicol, TIL-Tilmicosin, TRM-Trimethoprim, BR-Brodinoprim, CEF-Cefquinom, RIF-Rifampicin.

Die Transkription der meisten Virulenzgene wurde durch fünf der acht Antibiotika (Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin, Trimethoprim und Brodimoprim) überwiegend reprimiert (Tab. 14). Dabei betrug der Anteil der Virulenzfaktoren an der Gesamtzahl der regulierten Gene bis zu 15 % wie im Fall von Trimethoprim (Tab. 14). Tilmicosin reprimierte beispielsweise die Transkription von 30 Virulenzgenen, während es nur die von zwei anderen Virulenzgenen induzierte. Einzig Rifampicin induzierte die Expression von mehr Virulenzfaktoren (17) als es reprimierte (7).

Tabelle 14. Anzahl der regulierten *P. multocida* Virulenzfaktoren nach Zugabe der 1xMHK von Antibiotika des Referenzkompendiums.

Antibiotika	10 min		30 min	
	Induziert (%) [*]	Reprimiert (%) [*]	Induziert (%) [*]	Reprimiert (%) [*]
Novobiocin	12 (4,1)	36 (7,3)	14 (3,9)	29 (6,7)
Enrofloxacin	0 (0,0)	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (9,1)
Florfenicol	4 (2,1)	2 (1,1)	7 (2,7)	33 (11,5)
Tilmicosin	2 (1,2)	30 (12,8)	2 (0,7)	41 (11,3)
Trimethoprim	7 (4,4)	23 (13,1)	6 (4,8)	17 (14,9)
Brodimoprim	5 (4,4)	12 (10,1)	3 (2,7)	16 (13,7)
Cefquinom	0 (0,0)	1 (16,7)	3 (7,5)	2 (6,5)
Rifampicin	17 (7,3)	7 (5,3)	16 (4,0)	7 (3,5)

* (%): Prozent der regulierten Virulenzfaktoren bezogen auf die Gesamtzahl der regulierten Gene pro Antibiotikum.

Die zehnfache MHK der drei Antibiotika Novobiocin, Trimethoprim und Cefquinom zeigte eine geringe Veränderung in der Anzahl der regulierten Virulenzgene in *P. multocida* im Vergleich zur einfachen MHK dieser Substanzen (Abb. 24). Bei den restlichen vier Antibiotika war eine starke konzentrationsabhängige Zunahme in der Anzahl der regulierten Virulenzgene zu beobachten. So stieg bei Tilmicosin die Anzahl der regulierten Virulenzfaktoren um 36 % und bei Enrofloxacin sogar um 93 % (Abb. 24).

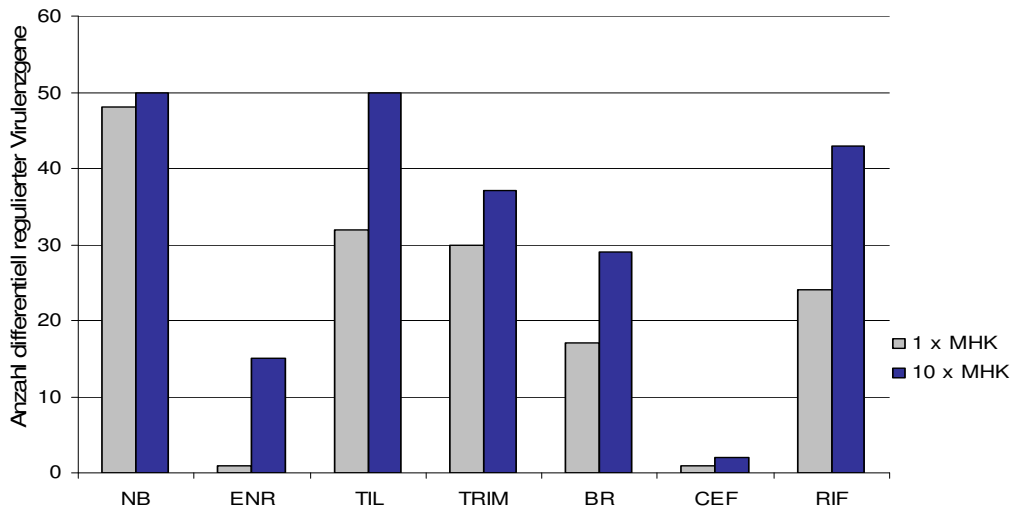


Abb. 24. Die Anzahl der differentiell exprimierten *P. multocida* Virulenzfaktoren nach Zugabe der 1xMHK bzw. 10xMHK der Antibiotika des Referenzkompendiums. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Antibiotika erfolgte für 10 min: NB-Novobiocin, ENR-Enrofloxin, TIL-Tilmicosin, TRM-Trimethoprim, BR-Brodimoprim, CEF-Cefquionome, RIF-Rifampicin.

Die Expression der Virulenzgene, die für verschiedene Eisentransporter (*exbBD*, *tonB*), Kapselsynthese- und Transportproteine (*hexABCD*), sowie für die Proteine der LPS-Synthese (*galE*, *glpQ*), Kompetenz (*comABCDEFM*), Adhärenz (*tadABCDEF*, *pfhB1*, *pfhB2*, *attK*) und das Hämolyisin (*lspB1*) kodieren, wurden am stärksten beeinflusst (Abb. 23). Interessanterweise zählen viele dieser Proteine zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren von *P. multocida* (May *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2004b; Harper *et al.*, 2006; Tomich *et al.*, 2007). Die meisten der Virulenz-assoziierten Gene wurden durch mehrere Antibiotika in ähnlicher Weise reguliert (Abb. 23). Ein Beispiel hierfür sind die *tonB*, *exbBD* Gene, deren Proteine an der Generierung der Energie für den Eisentransport beteiligt sind (Braun, 1995). Der *tonB exbBD*-Locus wurde von allen bakteriostatisch wirkenden Antibiotika des Referenzkompendiums (Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin, Trimethoprim, Brodimoprim und Rifampicin) zweifach bis siebenfach reprimiert (Abb. 23). Darüber hinaus wurden die Gene, die für das Eisenbindungsprotein FbpA und für den Eisentransporter Afu-ABC kodieren, durch Novobiocin, Florfenicol und Tilmicosin reprimiert. Die Transkription des Eisenregulators Fur wurde nur schwach durch Novobiocin induziert.

Die Polysaccharid-Kapsel ist ein bedeutender Virulenzfaktor und für die erfolgreiche Kolonisierung von *P. multocida* im Wirt essentiell (Chung *et al.*, 2001). Die Transkription von neun Kapsel-Biosynthese- und Transport-Genen (PM0772-PM0774, PM0776-PM0781) wurde durch Novobiocin, Florfenicol,

Tilmicosin, Trimethoprim und Brodimoprim stark reprimiert (Abb. 23). Die beiden letzt genannten Antibiotika reprimierten die Transkription der Kapsel-Gene vor allem nach langer Inkubation mit dem Antibiotikum (30 min). Novobiocin reprimierte die Expression dieser Gene am stärksten (zwischen vier- und 16-fach).

P. multocida produziert zwei Formen des filamentösen Hämagglutinins, PfhB1 und PfhB2, welche möglicherweise bei der Adhärenz der Bakterien involviert sind (May *et al.*, 2001). Die Sekretion dieser Filamente wird durch die *lpsB1*- und *lpsB2*- Genprodukte vermittelt. Die Transkription beider *pfhB*-Gene wurde durch Novobiocin, Florfenicol und Tilmicosin mittelstark reprimiert (Abb. 23). Zusätzlich hemmten Novobiocin und Tilmicosin die Transkription von *lspB1*.

Mehrere Antibiotika des Referenzkompendiums wirkten auf die Transkription der DNA Kompetenz *comABCDEFM* Locus reprimierend (Abb. 23). Die Genprodukte dieses Locus sind in die DNA-Aufnahme involviert (May *et al.*, 2001). Die *comABCD*-Gene sind in einem Operon organisiert, während das *comM*- sowie das *comF* Gen an einem anderem Ort des *P. multocida* Genoms lokalisiert sind (May *et al.*, 2001). Trimethoprim reprimierte die Transkription des *comABCD*-Operons zu beiden Zeitpunkten, Tilmicosin und Florfenicol erst nach 30 min Inkubation mit den beiden Antibiotika (Abb. 23). Die beiden letzt genannten Antibiotika zeigten auch einen starken negativen Effekt auf die *comM* Transkription, sowie weniger stark auf die *comF* Transkription.

Die Transkription von insgesamt 16 Genen, die an der Synthese und der Modifikation von LPS beteiligt sind, wurde durch mehrere Antibiotika induziert bzw. reprimiert (Abb. 23). Beispielsweise reprimierte Novobiocin die Expression des *galE* Gens, welches für die Galaktose-Epimerase kodiert. Dieses Protein ist an der LPS-Synthese beteiligt und zählt zu den bedeutenden Virulenzfaktoren von *P. multocida* (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wurde das *glpQ*-Gen, das für den Transfer von Cholin auf LPS verantwortlich ist (Harper *et al.*, 2006), durch Novobiocin induziert (Abb. 23).

Neben dem *glpQ*-Gen wurden nur wenige weitere Virulenzgene durch die Antibiotika positiv reguliert, wie z. B. das *hktE* Gen für die Katalase und *so-dAC* Gene für die Superoxid-Dismutase (Abb. 23). Diese Gene wurden durch Novobiocin und Florfenicol induziert. Der *tadABCDEF*-Locus, der sich auf einer Pathogenitätsinsel befindet und für Adhärenzproteine kodiert (Tomich *et al.*, 2007), wurde ausschließlich durch Rifampicin induziert (Abb. 23).

3.2.2 Regulation der Virulenzgene bei *M. haemolytica*

In *M. haemolytica* wurde im Vergleich mit *P. multocida* durch die Antibiotika eine ähnliche Anzahl von Virulenzfaktoren (78) differentiell exprimiert (Abb. A3, Tab. 15). Die Inhibitoren der Proteinbiosynthese Florfenicol und Tilmicosin beeinflussten die Transkription der meisten *M. haemolytica* Virulenzfaktoren (Tab. 15). Nach 10 min Inkubation mit Florfenicol wurde die Expression von insgesamt 25 Virulenzgenen und nach 30 min von 53 Virulenzgenen reguliert. Durch Tilmicosin wurde im Vergleich zur Kontrolle die Transkription von acht Virulenzgenen nach 10 min und von 30 Virulenzgenen nach 30 min Inkubation variiert (Tab. 15). In den meisten Fällen lag wie bei *P. multocida* eine Repression der Transkription vor.

Die Expression nur weniger Virulenzgene wurden von Enrofloxacin, Brodimoprim und Cefquinom beeinflusst (Tab. 15). Zu den reprimierten Virulenzfaktoren zählten beispielsweise Gene, die für Leukotoxin (*lktAB*) und für das *tonB exbBD* Eisenaufnahmesystem kodieren (Abb. A3). Zu den wenigen überexprimierten Genen zählten die *clpB*-Protease, die DNA-Methylase *dam* und zwei Gene aus den Eisenaufnahmesystemen, der Regulator *fur* und das Häm-Bindungsprotein *hbpA*.

Tabelle 15. Anzahl der regulierten *M. haemolytica* Virulenzfaktoren nach Zugabe der 1xMHK der Antibiotika des Referenzkompendiums.

Antibiotika	10 min		30 min	
	Induziert (%) [*]	Reprimiert (%)	Induziert (%)	Reprimiert (%)
Novobiocin	4 (4,4)	14 (8,7)	2 (5,3)	11 (11,0)
Enrofloxacin	1 (7,1)	0 (0)	2 (8,7)	1 (9,1)
Florfenicol	4 (3,1)	21 (10,1)	14 (5,5)	39 (12,6)
Tilmicosin	0 -	8 (4,9)	9 (4,8)	21 (8,1)
Trimethoprim	0 -	3 (10,8)	7 (8,8)	5 (11,9)
Brodimoprim	0 -	0 -	1 (7,1)	2 (12,5)
Cefquinom	2 (12,5)	1 (5,6)	6 (22,2)	2 (18,2)
Rifampicin	1 (3,6)	1 (20,0)	7 (13,2)	4 (17,4)

* (%): Prozent der regulierten Virulenzfaktoren bezogen auf die Gesamtzahl der regulierten Gene pro Antibiotikum.

Der konzentrationsabhängige Effekt auf die Transkription der Virulenzgene war in *M. haemolytica* stärker ausgeprägt als in *P. multocida* (Abb. 24, 25). Die bakterizid wirkenden Antibiotika Enrofloxacin und Cefquinom übten bei beiden Konzentrationen nur einen geringen Einfluss auf die Expression der Virulenzgene von *M. haemolytica* aus (Abb. 26).

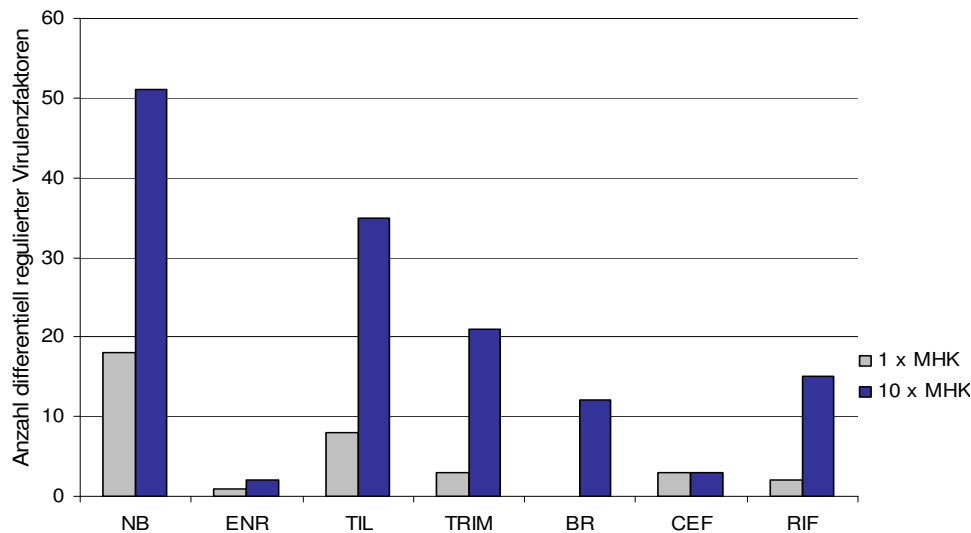


Abb. 25. Die Anzahl der differentiell exprimierten *M. haemolytica* Virulenzfaktoren nach Zugabe der 1xMHK bzw. 10xMHK der Antibiotika des Referenzkompendiums. Die Inkubation erfolgte mit den unterschiedlichen Antibiotika für 10 min: NB-Novobiocin, ENR-Enrofloxacin, TIL-Tilmicosin, TRM-Trimethoprim, BR-Brodinoprim, CEF-Cefquinom, RIF-Rifampicin.

3.2.3 Phänotypische Charakterisierung der Kapsel von *P. multocida* nach Antibiotika-Behandlung

Neun Kapselbiosynthese- und Transport Gene von *P. multocida* wurden durch fünf Antibiotika des Referenzkompendiums reprimiert (Tab. 16). Zur Charakterisierung des Einflusses der Transkriptionsrepression der Kapselgene auf die Ausbildung der Kapsel wurde *P. multocida* mit der halben MHK von Novobiocin, Florfenicol und Trimethoprim für drei Stunden inkubiert. Diese drei Antibiotika wurden ausgesucht, weil sie den größten Einfluss auf die Transkription der Kapselgene ausübten (Tab. 16). Deswegen sollte das Wachstum der Bakterien nicht vollständig unterbunden, sondern nur gering gehemmt werden. Dies wurde durch die Auswahl der halben MHK gewährleistet. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit Enrofloxacin behandelte Bakterien, da dieses Antibiotikum keine Auswirkung auf die Transkription der Kapselgene besaß (Abb. 23). Die Bakterien wurden nach drei Stunden Inkubation in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, noch bevor Wachstumsef-

fekte in der stationären Phase auf die Kapsel zu erwarten waren (Jacques & Foiry, 1987). Nach der Färbung der Kapsel mit Ferritin wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der behandelten und unbehandelten Zellen gemacht (Abb. 26).

Tabelle 16. Differentiell exprimierte Kapsel-Biosynthese- und -Transport-Gene von *P. multocida*.

Gen-Name	Expressionsänderung (Log ₂)												Gen-ID	
	NB		FFC		TIL		RIF		TRM		BR			
	10'	30'	10'	30'	10'	30'	10'	30'	10'	30'	10'	30'		
<i>phyB</i>	-2,9	-2,1	-*	-	-	-	-	-	-	-	-1,1	-	-0,7	PM0772
<i>phyA</i>	-3,5	-3,1	-	-1,5	-0,6	-1,3	-	-	-0,6	-1,2	-	-1,2	PM0773	
<i>hyaE</i>	-4,3	-3,7	-0,8	-1,9	-1,2	-2,4	-	-	-	-1,2	-	-1,3	PM0774	
<i>hyaC</i>	-3,3	-3,2	-1,0	-2,7	-1,6	-3,7	-	-	-	-1,2	-	-1,5	PM0776	
<i>hyaB</i>	-3,0	-2,6	-0,9	-2,2	-2,5	-4,6	0,7	0,9	-0,7	-1,0	-1,0	-1,8	PM0777	
<i>hexD</i>	-2,8	-2,8	-1,3	-3,2	-2,2	-5,1	0,8	-	-1,0	-1,2	-	-2,2	PM0778	
<i>hexC</i>	-2,3	-2,6	-2,0	-3,8	-3,1	-4,8	-	-	-1,6	-1,7	-0,9	-1,8	PM0779	
<i>hexB</i>	-3,2	-3,0	-2,5	-3,9	-2,8	-4,8	0,6	-	-1,3	-1,4	-	-1,9	PM0780	
<i>hexA</i>	-2,1	-2,3	-1,7	-2,5	-1,7	-3,1	-	-	-1,0	-1,2	-0,7	-1,4	PM0781	
<i>wza</i>	-	-	-	-	-	-	2,1	2,7	-	-	-	-	PM1016	
<i>wzb</i>	-	-	-	-	-	-	2,6	3,4	-	-	-	-	PM1017	

*- keine Regulation.

Die Antibiotika-Konzentration betrug 1 x MHK.

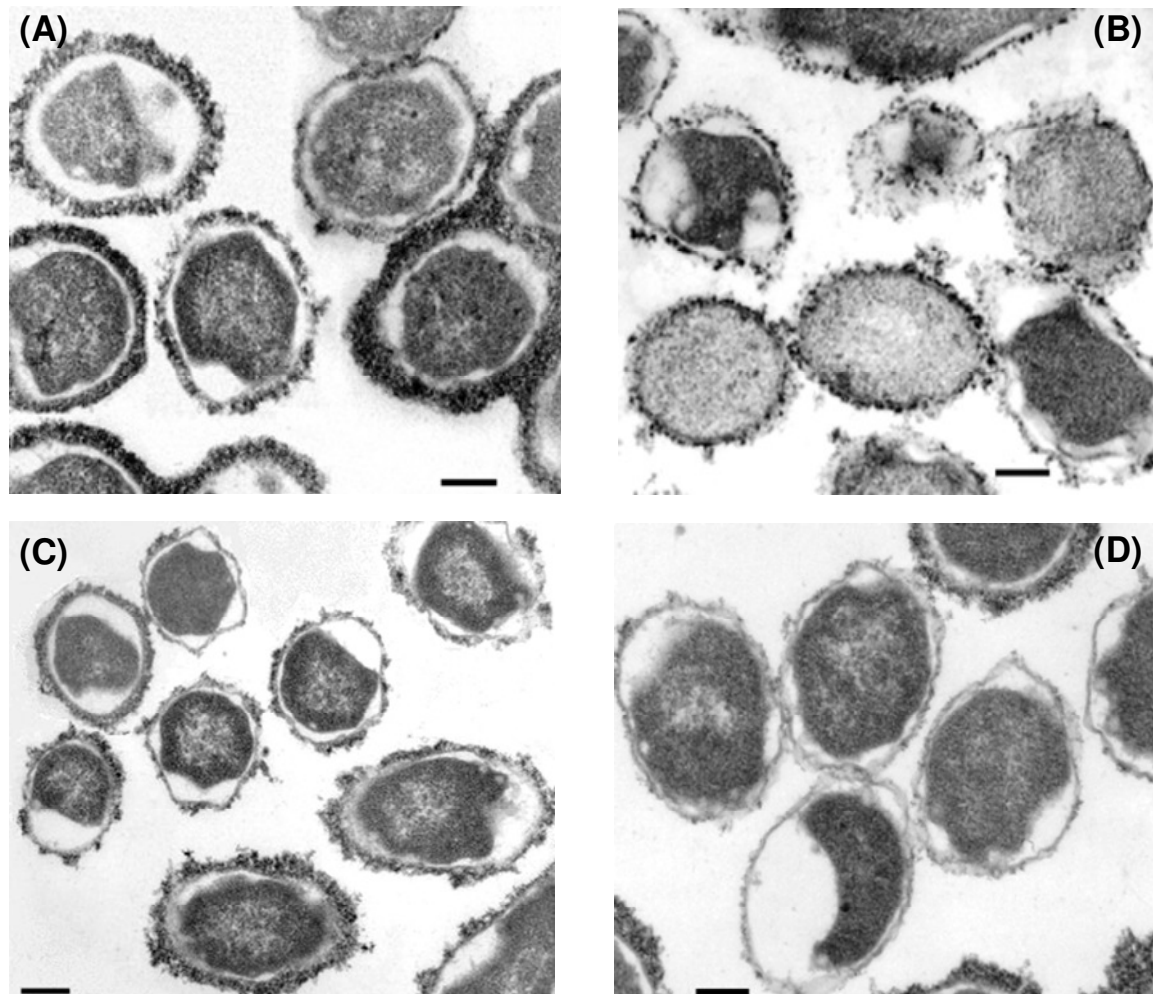


Abb. 26. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kapsel von *P. multocida* nach Antibiotika Behandlung. Die Bakterien wurden mit unterschiedlichen Antibiotika ($\frac{1}{2}$ x MHK für 3 h) behandelt. (A) - unbehandelte Kontrolle, (B) - Novobiocin, (C) - Florfenicol, (D) - Trimethoprim. Balken = 200 nm.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Kapsel der Novobiocin-behandelten Bakterien unvollständig ausgebildet (Abb. 26 A und B). Die Behandlung der Bakterien mit Florfenicol führte ebenfalls zu einer unvollständig ausgebildeten Kapsel bzw. bei einigen Zellen zum völligen Verlust der Kapsel (Abb. 26 C). Wie aus der Abb. 26 D ersichtlich ist, entstand nach der Behandlung mit Trimethoprim eine Mischpopulation der Bakterien. Einige *P. multocida* Zellen zeigten noch eine vollständig ausgebildete Kapsel, die meisten Bakterien bildeten jedoch keine Kapsel aus.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermöglichten, die Kapseldicke der unbehandelten Kontrollzellen und der mit Antibiotikum behandelten *P. multocida* zu messen und in drei unterschiedliche Ausprägungsgruppen einzuteilen, welches eine Quantifizierung des Effekts erlaubte (Abb. 27). In Abwesenheit der Antibiotika (Kontrolle) zeigten ca. 65 % aller *P. multocida*

Zellen eine Kapseldicke von mehr als 30 nm, ca. 30 % der Zellen wiesen eine intermediäre Kapseldicke (<30 nm) auf, und die restlichen Bakterien hatten keine messbare Kapsel auf der Oberfläche. Nach Behandlung mit Novobiocin zeigten ca. 98 % der Bakterien eine intermediär ausgebildete Kapsel von < 30 nm Dicke (Abb. 27). Keine Kapsel bildeten ca. 56 % der mit Trimethoprim inkubierten Bakterien (Abb. 27). Während die Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe bei Novobiocin- und Trimethoprim behandelten Zellen statistisch signifikant waren, zeigten die Florfenicol behandelten Zellen keinen statistisch abgesicherten Effekt. Tendenziell bildete jedoch ein größerer Anteil der Florfenicol behandelten Bakterien keine Kapsel mehr aus (Abb. 27). Die Aufteilung der Kapseldicke der Florfenicol behandelten Zellen ähnelte der von Enrofloxacin behandelten, wo gleichfalls kein signifikanter Effekt auf die *P. multocida* Kapselbildung zu erkennen war (Abb. 27). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Korrelation zwischen der Reprimierung der Expression von *P. multocida* Kapselgenen durch zwei Antibiotika Novobiocin und Trimethoprim mit einer statistisch signifikanten verminderten Kapselausprägung gezeigt werden konnte.

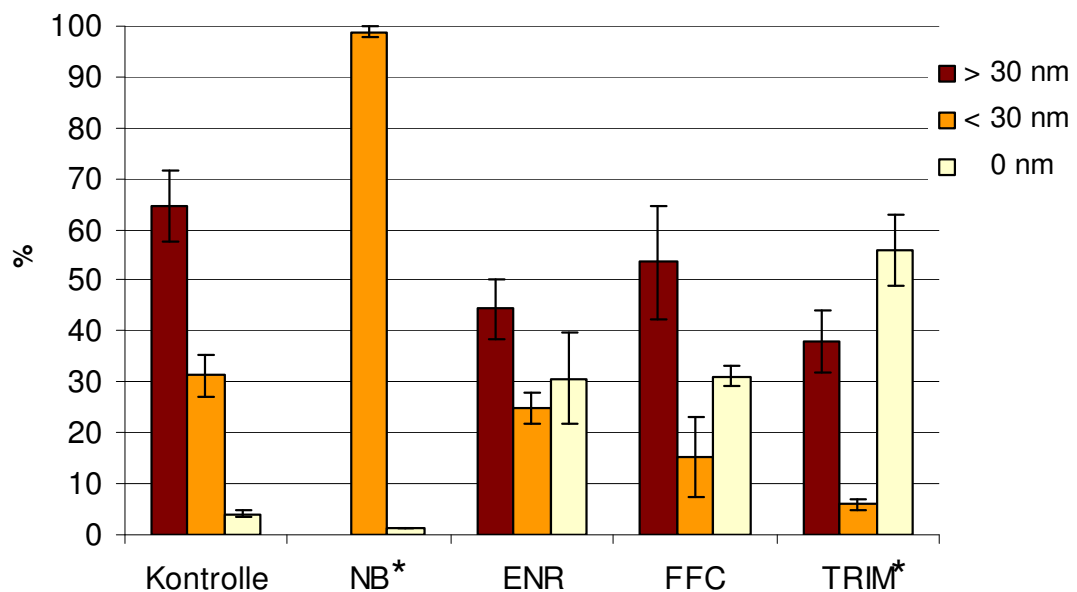


Abb. 27. Der Effekt der Antibiotika auf die Kapsel. *P. multocida* wurde für drei Stunden mit $\frac{1}{2}$ x MHK der Antibiotika inkubiert und nach der Färbung mit Ferritin fixiert und im EM visualisiert. Die Abszisse zeigt den Prozentsatz der Zellen mit einer Kapseldicke von > 30 nm, < 30 nm und ohne Kapsel an. Die Experimente wurden dreifach wiederholt und pro Experiment mindestens 80 Zellen betrachtet. (*) markiert statistisch signifikante Experimente ($p < 0.05$, Students t-Test).

3.2.4 Einfluss der Reprimierung der Eisentransportgene auf das Bakterienwachstum

Eisen ist für das Wachstum der Bakterien im Wirtsorganismus und für die Entfaltung der Virulenz der Bakterien essentiell. Eisen dient als Cofaktor und ist an zahlreichen metabolischen Prozessen beteiligt (Graham & Lo, 1997; 2002; Kirby *et al.*, 1998). Mehrere Antibiotika des Referenzkompendiums übten einen negativen Effekt auf die Expression der Eisentransporter in *P. multocida* und *M. haemolytica* aus (Abb. 23, Tab. 17). Von den acht Antibiotika des Referenzkompendiums hatte nur Florfenicol einen ausgeprägten negativen Effekt auf die Transkription der Eisentransporter in *M. haemolytica* (Tab. 16), wobei der komplette *fbpABC* Locus reprimiert wurde. Diese *ferric-binding* Proteine sind an der Internalisierung des Eisens von Transferrin beteiligt (Kirby *et al.*, 1998). MH1315 ist ein putatives Transferrin-bindendes Protein, dessen Expression von beiden Transkriptionseinhibitoren gehemmt wurde (Tab. 17). Die Expression der Gene *exbBD* wurde nach nur 30 min Inkubation mit einfachen MHK Florfenicol leicht reprimiert, die Transkription von *tonB* wurde nicht beeinflusst (Tab. 17).

Tabelle 17. Regulierte *M. haemolytica* Eisengene nach Inkubation mit der einfachen MHK der Antibiotika des Referenzkompendiums.

Gen-Name	Expressionsänderung (Log ₂)						Gen-ID
	NB		FFC		TIL		
	10'	30'	10'	30'	10'	30'	
<i>exbB</i>				-0,73			MH0699
<i>exbD</i>				-0,67			MH0700
<i>tonB</i>						-0,78	MH0701
<i>fbpA</i>			-1,78	-2,48		-1,10	MH0877
<i>fbpB</i>	0,67		-0,61	-0,62			MH0876
<i>fbpC</i>	0,78		-0,90	-1,35		-0,84	MH0875
<i>fecB</i>			-0,68	-1,18			MH1130
<i>fhuB</i>			-0,99	-1,19			MH1129
<i>frpB</i>	-1,32	-1,19		-0,72			MH0980
<i>fur</i>				0,64		0,73	MH2522
MH1315			-1,95	-1,45	-1,00	-1,96	MH1315

Wahrscheinlich wirkte sich die Reprimierung der Expression verschiedener Eisentransporter negativ auf die Eisenaufnahme von *P. multocida* und *M. haemolytica* aus. Dementsprechend sollte dies auch einen negativen Effekt auf das Wachstum der Bakterien nach sich ziehen. Durch Wachstumsversuche wurde diese mögliche Auswirkung der Antibiotika in Anwesenheit unterschiedlicher Eisenquellen überprüft. Unter Eisenmangelbedingungen, erzeugt durch die Zugabe des Eisenchelators Desferal, wurden den Bakterien drei

unterschiedliche Eisenquellen, Hämoglobin, FeCl₃ und bovines Transferrin, auf Filterpapier angeboten. Filterplättchen mit H₂O bzw. PBS dienten als Kontrolle. *M. haemolytica* konnte alle drei Eisenquellen nutzen (Abb. 28). *P. multocida* L386 besitzt kein Transportsystem für die Aufnahme von Eisen aus Transferrin (Röhrig *et al.*, 2007). Daher konnte bei *P. multocida* L386 die Wachstumshemmung durch Zugabe von Transferrin nicht aufgehoben werden (Abb. 28). *P. multocida* konnte jedoch die beiden anderen Eisenquellen (FeCl₃ und Hämoglobin) nutzen (Abb. 28).

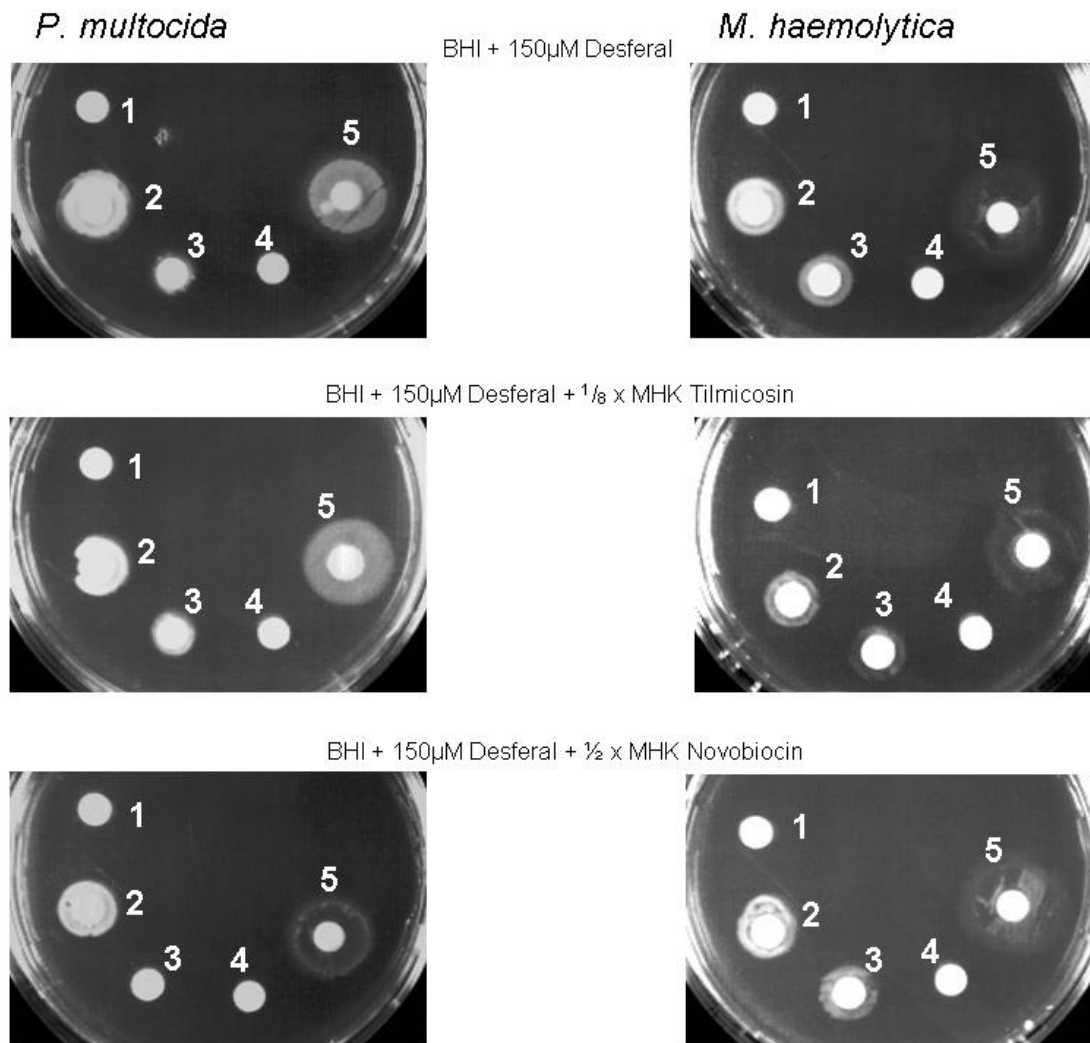


Abb. 28. Beispiele für das Wachstum von *P. multocida* und *M. haemolytica* in Abhängigkeit von verschiedener Eisenquellen und Antibiotika. Die Filterpapier Plättchen wurden mit H₂O (1), FeCl₃ (2), bovines Transferrin (3), PBS (4) und Hämoglobin (5) getränkt. Bakterine wurden für 24 h bei 37°C ausplattiert. Um die Filterpapier-Plättchen 1 und 4 (Lösungsmittelkontrolle) sind keine Wachstumszonen zu sehen.

Durch die Zugabe der Antibiotika Novobiocin, Florfenicol und Tilmicosin, die einen negativen Effekt auf die Transkription von *tonB*, *exbBD* und *fbpABCD* hatten (Abb. 23, Tab. 17), sollte überprüft werden, ob die verringerte Transkription zu einer Verringerung der Eisenversorgung und somit zu einer Wachstumsverzögerung führt. Für dieses Experiment musste die Antibiotikumkonzentration auf $\frac{1}{2}$ x MHK für Novobiocin und Florfenicol und auf $\frac{1}{8}$ x MHK für Tilmicosin herabgesetzt werden, da bei höheren Konzentrationen auf den Kontrollplatten (BHI+Antibiotika) das Wachstum von *P. multocida* und *M. haemolytica* vollständig gehemmt wurde (Tab. 18). Die Wachstumszonen von *P. multocida* um die mit FeCl_3 getränkten Filterpapier Plättchen und von *M. haemolytica* um die mit FeCl_3 bzw. Transferrin Eisenquellen betragen zwischen 0,5 cm und 1 cm (Abb. 28, Tab. 18). Um die mit Hämoglobin getränkten Plättchen wurden bei beiden Bakterienstämmen größere Wachstumszonen mit einem Durchmesser von >1 cm gemessen (Tab. 18). Die Zugabe der Antibiotika zeigte keinen Effekt auf das eisenabhängige Wachstum. Die Wachstumszonen um die mit Hämoglobin, FeCl_3 bzw. Transferrin getränkten Filterpapier-Plättchen waren bei allen vier Wachstumsbedingungen, Kontrolle und 3 Antibiotika, vergleichbar groß (Tab. 18).

Tabelle 18. Wachstum von *M. haemolytica* (A) und *P. multocida* (B) in Abhängigkeit von verschiedenen Antibiotika und Eisenquellen.

(A) <i>M. haemolytica</i>		BHI Platten ohne Desferal	Eisenquellen auf Desferal-BHI Platten			
Antibiotika			H ₂ O	+FeCl ₃	+HB	+TRA
Kontrolle		BR	-	++	+++	++
Novobiocin	1/2 x MHK	BR	-	++	+++	++
	1 x MHK	-	-	-	-	-
Florfenicol	1/2 x MHK	BR	-	++	++	++
	1 x MHK	-	-	-	-	-
Tilmicosin	1/8 x MHK	BR	-	++	+++	++
	1/2 x MHK	-	-	-	-	-
	1 x MHK	-	-	-	-	-

(B) <i>P. multocida</i>		BHI Platten ohne Desferal	Eisenquellen auf Desferal-BHI Platten			
Antibioti-			H ₂ O	+FeCl ₃	+HB	+TRA
Kontrolle		BR	-	++	+++	-
Novobiocin	1/8 x MHK	BR	-	++	+++	-
	1/2 x MHK	BR	-	++	+++	-
	1 x MHK	-	-	-	-	-
Florfenicol	1/2 x MHK	BR	-	++	+++	-
	1 x MHK	-	-	-	-	-
Tilmicosin	1/8 x MHK	BR	-	++	+++	-
	1/2 x MHK	-	-	-	-	-
	1 x MHK	-	-	-	-	-

Die Versuche wurden gemäß dem Beispiel in Abb. 27 dreifach durchgeführt. Kontrolle: BHI-Agarplatten ohne Desferal. Wachstumsbewertung: BR: Bakterienrasen, - kein Wachstum, + Wachstumszone Diameter < 0,5 cm, ++ Wachstumszone Diameter 0,5 < 1 cm, +++ Wachstumszone Diameter > 1 cm. HB: Hämoglobin, TRA: Transferrin.

3.3 Einfluss von Thiazin auf das Transkriptom von *P. multocida* und *M. haemolytica*

Das Thiazin zeigte eine sehr gute bakterizide Aktivität gegen *P. multocida* und *M. haemolytica* (Tab. 5). Zu Beginn dieser Arbeit war weder der MoA bekannt, noch waren Expressionsprofile mit dieser Substanz erstellt worden. Um einen ersten Hinweis auf den Wirkmechanismus des Thiazins zu bekommen, wurden Thiazin-induzierte Transkriptionsprofile in *P. multocida* und

M. haemolytica mittels *microarray* nach dem Standardprotokoll für das Referenzkompendium aufgenommen. Im Folgenden werden die Transkriptionsanalysen der Thiazin-Wirkung auf *P. multocida* dargestellt und nur auf die entsprechenden *M. haemolytica* Daten eingegangen, wenn sie Erkenntnisse über den MoA lieferten.

Das Thiazin regulierte bei einfachen MHK nach 10- und 30-minütiger Inkubation die Transkription von nur sehr wenigen *P. multocida* Genen (Tab. 19). Ein Anstieg der Anzahl der regulierten Gene durch das Thiazin blieb nach 30-minütiger Inkubation bei einfacher MHK im Gegensatz zu den Antibiotika des Referenzkompendiums aus. Die Regulation von nur vier Genen wurde nach der längeren Inkubationszeit beobachtet (Tab. 19). Außerordentlich groß war die konzentrationsabhängige Wirkung auf das Transkriptom von *P. multocida*. Die Anzahl der regulierten Gene stieg von 1,4 % des Genoms bei Verwendung der einfachen MHK auf fast 20 % bei der zehnfachen MHK an (Tab. 19).

Tabelle 19. Anzahl der regulierten *P. multocida* Gene nach der Inkubation mit Thiazin.

Konzentration, Inkubationszeit	Induziert	regulierte <i>P. multocida</i> Gene		
		Reprimiert	Gesamt	% Genome
1xMHK, 10min	1	26	27	1,4
1xMHK, 30min	2	2	4	0,2
10xMHK, 10min	237	154	391	19,6

Um Ähnlichkeiten zwischen den Thiazin-induzierten Expressionsprofilen und den Expressionsprofilen der Substanzen des Referenzkompendiums festzustellen, wurde eine globale *cluster* Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden fünf *cluster* gebildet (Abb. 29). Die Thiazin-induzierten Expressionsprofile bildeten dabei ein gemeinsames *cluster* mit den Expressionsprofilen von Cefquinom und Enrofloxacin (Abb. 29). Dieses Ergebnis vermittelte keinen direkten Hinweis auf den MoA von Thiazin, da auch Enrofloxacin (DNA Gyrase) und Cefquinom (Zellwandbiosynthese) unterschiedliche *targets* inhibieren, zeigte aber, dass die Expressionsprofile der bakterizid wirkenden Antibiotika sich von denen der bakteriostatischen Antibiotika unterscheiden.

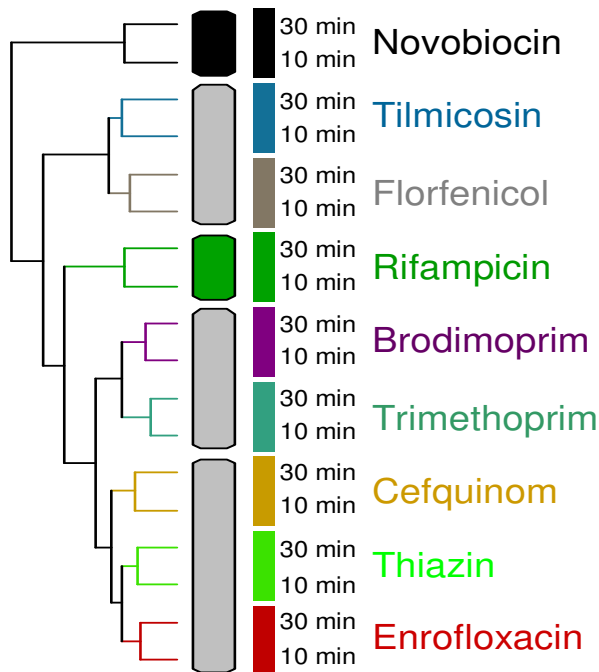


Abb. 29. Hierarchische Cluster Analyse der Expressionsprofile des Referenzkompendiums und der Thiazin-induzierten Expressionsprofile von *P. multocida*.

Die Einteilung der regulierten Gene in funktionelle Gruppen und die Identifizierung der durch Thiazin spezifisch regulierten Gene sollten zusätzliche Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von Thiazin geben. Die funktionelle Einteilung der durch Thiazin bei einfacher MHK regulierten Gene von *P. multocida* zeigte, dass die im Referenzkompendium generell regulierten funktionellen Gruppen Energie & zentraler intermediärer Metabolismus, Protein Modifikation & Abbau und Transport- & Bindeproteine auch durch das Thiazin beeinflusst wurden (Abb. 30). Weiterhin reprimierte es einige wenige Gene aus der Aminosäure- und Cofaktoren Biosynthese (Abb. 30). Die nahezu ausschließliche Reprimierung der Gene der betroffenen funktionellen Gruppen war spezifisch für das Thiazin. Nur ein Gen aus der Transportgruppe wurde durch die Substanz induziert.

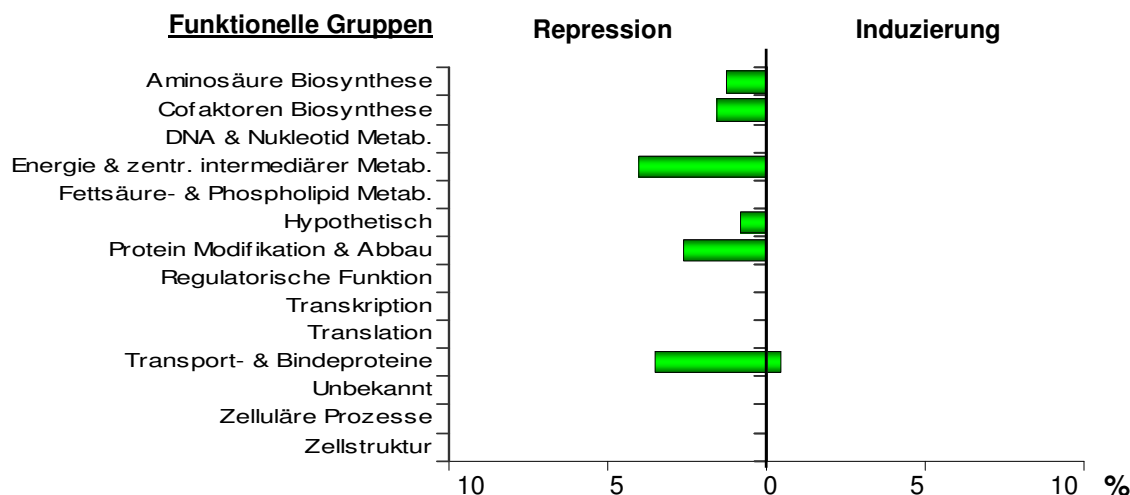


Abb. 30. Einteilung der regulierten Gene von *P. multocida* in funktionelle Gruppen. *P. multocida* wurde für 10 min mit 1xMHK Thiazin behandelt. Die Abszisse zeigt den Anteil regulierter Gene pro funktionelle Gruppe in %. Metab.-Metabolismus. TZ-Thiazin.

Von den 31 durch das Thiazin bei 1xMHK regulierten Genen waren zwei ausschließlich durch das Thiazin und sonst keinem weiteren Antibiotikum reguliert. Das Gen *artM*, welches im Arginintransport involviert ist, wurde 1,5-fach induziert. Die schwache Induktion wurde ausschließlich nach 10 min Inkubation mit der einfachen MHK Thiazin beobachtet. Das zweite charakteristische Gen, *menA* (kodiert für eine Octaprenyltransferase), wurde durch Thiazin nur nach 30 min Inkubation reprimiert. Laut der in dieser Arbeit angewendeter Definition sind Signaturgene solche Gene, die durch ein Antibiotikum nach 10 min und 30 min Inkubation differentiell exprimiert werden. Für die beiden oben genannten Gene traf das nicht zu. Des Weiteren regulierte das Thiazin bei einfacher MHK keine Signaturgene der Substanzen des Referenzkompendiums (Tab. 10).

Auch die konzentrationsabhängige transkriptionelle Antwort in *P. multocida* wies keine eindeutige Ähnlichkeit mit den Expressionsprofilen der Substanzen des Referenzkompendiums auf (Tab. S2 in Melnikow *et al.*, 2008). Keine Veränderung der Höhe der Expression der Novobiocin- bzw. Enrofloxacin-spezifischen Gene wurde durch die Zugabe der zehnfachen MHK des Thiazins erzielt. So beeinflusste Thiazin weder die Expression der DNA Gyrase noch die SOS-Antwort. Die Reprimierung nur weniger ribosomaler Gene und die fehlende Induktion dieser Gene deutet daraufhin, dass Thiazin kein Transkriptioneninhibitor ist, denn die Transkriptioneninhibitoren Florfenicol und Tilmicosin hatten die Expression von ca. 25 % aller ribosomalen Gene induziert. Das induzierte Signaturgen von Trimethoprim *folD* wurde durch das

Thiazin erst bei der zehnfachen MHK reprimiert, was auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus hinweist.

Während der MHK-Bestimmung für das Thiazin hat sich herausgestellt, dass das Thiazin zwar auf *M. haemolytica* und *P. multocida*, nicht jedoch auf Enterobakterium *E. coli* bakterizid wirkt. Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass das Zielgen des Thiazins in beiden Pasteurellen, nicht aber in dem Enterobakterium vorhanden ist. Die Expressionsdaten wurden daraufhin auf regulierte orthologe Gene von *P. multocida* und *M. haemolytica* untersucht, die in *E. coli* fehlen. Basierend auf den Expressionsprofilen des Referenzkompendiums wurde zusätzlich angenommen, dass die Transkription des gesuchten Zielgens in beiden Organismen durch Thiazin induziert und nicht reprimiert sein sollte.

Insgesamt induzierte das Thiazin in *M. haemolytica* und *P. multocida* die Expression von 18 orthologen Genen (Tab. A8). Davon kodieren elf Gene für Stressproteine, ein Gen für einen Eisentransporter und ein weiteres für ein hypothetisches Protein. Zwei weitere Gene kodieren für Proteine aus der Aminosäure-Biosynthese und zwei Proteine besitzen eine Funktion in der Zellwandbiosynthese. MH0057 ist eine potentielle Glykosyltransferase und wurde bei *M. haemolytica* nach 10 und 30 min Inkubation mit der einfachen MHK von Thiazin induziert. Das orthologe PM1562 wurde nach 10 min Inkubation mit zehnfacher MHK bei *P. multocida* induziert (Tab. A8). Ein MH0057 bzw. PM1562 orthologes Protein konnte in *E. coli* nicht gefunden werden. Die Gattungsspezifische Präsenz dieser potentiellen Glykosyltransferase in *P. multocida* und *M. haemolytica* korrelierte somit mit dem Wirkspektrum von Thiazin, was den Schluss nahe legt, dass MH0057 bzw. PM1562 möglicherweise für das Zielprotein des Thiazins kodieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte MH0057 in *M. haemolytica* überexprimiert und anschließend eine mögliche Abhängigkeit der Thiazin MHK von der Proteinmenge untersucht werden. Als erstes wurde das Gen MH0057 kloniert und sequenziert. Die Sequenz-Analyse aller sequenzierter Klone zeigte einen *frame-shift* in der Kodierungsregion des Gens MH0057. Es ist also anzunehmen, dass MH0057 in *M. haemolytica* nicht funktionell exprimiert wird. Da das Thiazin auf *M. haemolytica* wirkt, konnte somit MH0057 als Zielprotein ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde im Rahmen dieser Arbeit noch eine weitere Hypothese zum MoA des Thiazins überprüft. Die Analyse der Thiazin-induzierten Expressionsprofile von *M. haemolytica* zeigte eine starke Induktion der Gene,

die für unterschiedliche Eisentransportsysteme kodieren (Tab. 20). Da *M. haemolytica* auf Eisenmangel mit einer transkriptionellen Induktion von Eisentransportgenen reagiert (Roehrig *et al.*, 2007), lag die Vermutung nahe, dass das Thiazin zu einer Eisenunterversorgung und damit zu einem Wachstumsdefekt führte. Bei einem eisenabhängigen MoA sollte somit die MHK des Thiazins abhängig vom Eisengehalt im Medium sein.

Tabelle 20. Eisentransportgene induziert von 1xMHK Thiazin in *M. haemolytica*.

Gen ID	Annotation	Relative Expressionswerte (-fach)	
		10min	30min
MH0066	Eisen-Bindungsprotein yfeA	1,8	4,0
MH0067	Eisen-Bindungsprotein yfeB	2,0	4,1
MH0068	Eisen-Bindungsprotein yfeD	1,7	2,7
MH0069	Eisen-Bindungsprotein yfeC	1,7	3,2
MH0699	Transportprotein exbB	1,9	2,0
MH0700	Transportprotein exbD	1,9	2,2
MH0701	TonB-Protein	1,6	2,0
MH0877	Eisen-Bindungsprotein Precursor fbpA	3,4	8,4
MH0980	Eisen-regulated protein frpB	13,2	41,5
MH1083	Hypothetisches Protein	3,8	4,6
MH1128	Eisen-Bindungsprotein fecE	2,3	2,7
MH1129	Ferrichrom-Transportsystem fhuB	2,6	2,3
MH1130	Eisen-Bindungsprotein fecB	2,4	3,2
MH1440	Putativ Eisenbindungsprotein	6,1	9,4
MH1441	Kation-Transport ATPase	4,5	6,4
MH1506	Hypothetisches Protein	3,2	12,3
MH1507	Hämoglobin Receptor hmbR	5,7	20,4
MH1508	Hypothetisches Protein	2,2	5,1
MH1771	Eisenion-Bindungsprotein	3,3	6,7
MH1880	Transferrin Bindungsprotein TbpA	3,0	8,0
MH1881	Transferrin Bindungsprotein TbpB	3,0	6,4
MH2068	Eisen-Transportsystem fhuC	11,9	67,7

Der MHK-Wert vom Thiazin wurde im eisenlimitierten Medium sowie nach der Zugabe zusätzlicher Eisenquellen mittels der Mikrodilutionsmethode bestimmt. Um eisenarmes Medium zu generieren, wurde der Eisenchelator Dipyridyl in einer Konzentration von 200 µM zu dem Medium gegeben. Als zusätzliche Eisenquelle wurde dem Medium 1 mM Eisencitrat zugefügt. Diese Wachstumsbedingungen führten zu keiner Wachstumsveränderung (Kontrollwells). Unter eisenarmen Bedingungen addierten sich die Wirkung des Eisenmangels und die des Thiazins, und führten zusammen bei *M. haemolytica* zu einer geringen Abnahme des MHK-Wertes von 0,25 auf 0,125 µg/ml (Tab. 21). Nach der Zugabe des Eisencitrats veränderte sich der MHK-Wert jedoch nicht (Tab. 21). Bei *P. multocida* zeigte der Eisengehalt der Medien keinen

Einfluss auf den MHK-Wert vom Thiazin. Somit legt dieses Ergebnis keinen Zusammenhang zwischen antimikrobieller Wirkung von Thiazin und der Eisenaufnahme nahe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zwei aufgestellten Hypothesen über den möglichen Wirkmechanismus von Thiazin nicht bestätigt werden konnten.

Tabelle 21. Minimale Hemmkonzentration vom Thiazin bei *P. multocida* und *M. haemolytica* in Abhängigkeit vom Eisengehalt im Medium. Diese MHK-Werte wurden dreifach mittels Mikrodilutionsmethode bestimmt. TZ – Thiazin.

Antibiotikum	MHK, [$\mu\text{g/ml}$]	
	<i>M. haemolytica</i> M7/2	<i>P. multocida</i> L386
TZ	0,25	0,016
TZ + 200 μM Dipyridyl	0,125	0,016
TZ + 1 mM FeCitrat	0,25	0,016

3.4 Einfluss von C-30 auf das Transkriptom von *P. multocida*

Das halogenierte Furanon C-30 zeigt zwar einerseits *in vitro* keinen antibiotischen Effekt, andererseits wurde im Tierversuch eine therapeutische Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (Hentzer *et al.*, 2003). Weiterführende Studien in *P. aeruginosa* zeigten bei einer C-30 Konzentration von 10 μM einen regulatorischen Effekt auf die Expression der Virulenzfaktoren (Hentzer *et al.*, 2003). Um eine mögliche Wirkung von C-30 auf die Transkription der Virulenzfaktoren von *P. multocida* zu untersuchen, wurden die Bakterien für 10 min bzw. 30 min mit jeweils 10 μM bzw. 50 μM C-30 inkubiert. Diese ausgewählten Konzentrationen und Zeitpunkte entsprechen den Versuchsbedingungen für *P. aeruginosa* bei Hentzer *et al.* (2003). Bei beiden Konzentrationen zeigte sich bei *P. multocida* keine Wachstumshemmung. Die C-30-induzierten Expressionsprofile wurden mit Hilfe von *microarrays* aufgenommen und die zeitlichen und konzentrationsabhängigen Auswirkungen auf das Transkriptom von *P. multocida* wurden untersucht.

Die Expressionsprofile von mit C-30 behandelten *P. multocida* im Vergleich zu unbehandelten Kontrollbakterien zeigten einen dosis- und zeitabhängigen Effekt. Es wurden nach 10 min Inkubation mit 50 μM C-30 doppelt so viele Gene differentiell exprimiert wie nach 10 min Inkubation mit 10 μM C-30 (Tab. 22). Weiterhin wurden durch die längere Einwirkung der Substanz C-30 bei 50 μM mehr Gene reguliert (Tab. 22).

Tabelle 22. Anzahl der regulierten *P. multocida* Gene nach der Inkubation mit C-30.

C-30 Konzentration, Inkubationszeit	Induziert	Differenziell exprimierte Gene		
		Reprimiert	Gesamt	% Genom
10 µM, 10min	65	104	169	8,5
10 µM, 30min	31	63	94	4,7
50 µM, 10min	129	211	340	17,0
50 µM, 30min	380	333	713	35,7

Die globale *cluster*-Analyse der C-30-induzierten Expressionsprofile von *P. multocida* mit den Expressionsprofilen der Substanzen des Referenzkompendiums führte zu einer separaten C-30 Gruppe (Abb. 31). Diese Einteilung spiegelte den Unterschied in der Wirkungsweise von C-30 und der Substanzen des Referenzkompendiums wieder.

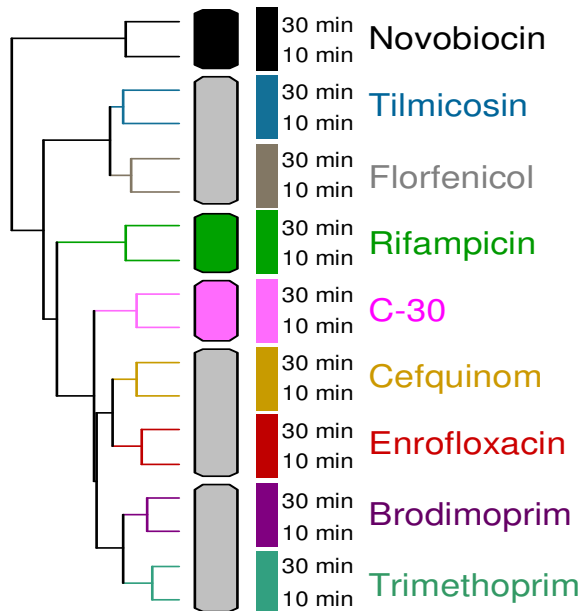


Abb. 31. Hierarchische *cluster*-Analyse der Wirkstoff-induzierten Expressionsprofile von *P. multocida*.

Für die C-30 Expressionsprofile von *P. multocida* war es charakteristisch, dass vornehmlich Gene mit einer Funktion in der Proteinmodifikation durch Zugabe von 10 µM C-30 induziert wurden (Abb. 32). Die starke Induktion (20 % aller Gene dieser Gruppe) wurde bei Antibiotika behandelten *P. multocida* nicht beobachtet. Die Reprimierung der Transkription von 20 % der Gene mit Bedeutung im Energie- & zentralen intermediären Metabolismus und 10 % der Gene mit Transport- und Bindeproteinen Eigenschaften war im Einklang mit den Ergebnissen des Referenzkompendiums (Abb. 32), da diese beiden

funktionellen Gruppen von den meisten Antibiotika des Referenzkompendi-
ums negativ beeinflusst wurde (Abb. 18).

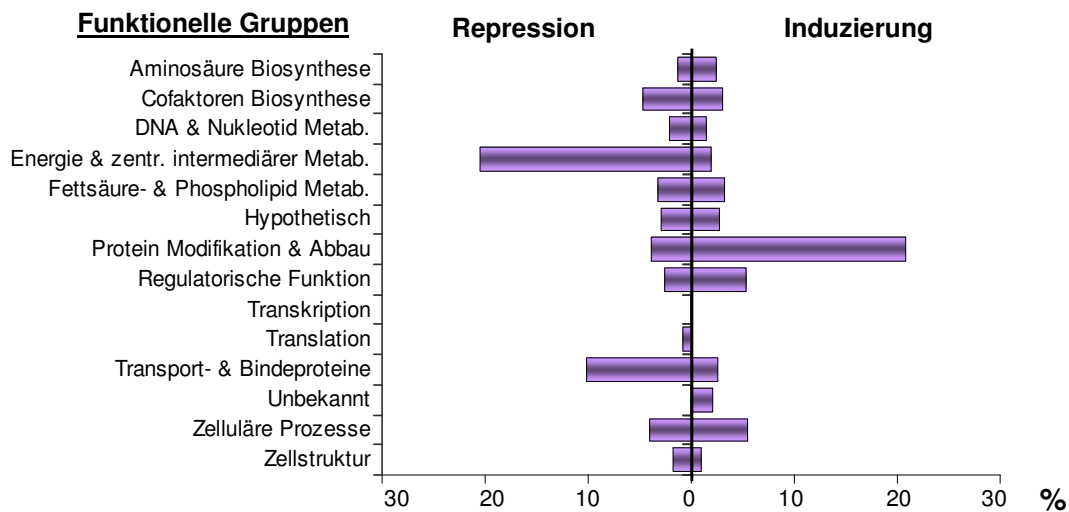


Abb. 32. Einteilung der C-30 regulierten Gene von *P. multocida* in funktionelle Gruppen. *P. multocida* wurde für 10 min mit 10 µM C-30 behandelt. Die Abszisse zeigt den Anteil regulierter Gene pro funktionelle Gruppe in %.

Von den 97 durch das Referenzkompendium regulierten Stressfaktoren von *P. multocida* (Abb. 19, Tab. A6) wurden 48 durch C-30 transkriptionell beeinflusst. Unter anderem wurde die Expression der Gene *groES* und *htpG* reguliert, welche nach Zugabe aller Antibiotika des Referenzkompendi-
ums differentiell exprimiert wurden. Nur zwei Gene wurden ausschließlich durch C-30 bei *P. multocida* reguliert: Diese kodieren für das hypothetische Protein PM0212 und das universale Stressprotein UspA. Die Transkription der Ziel-
gene der Antibiotika des Referenzkompendi-
ums wurde durch 10 µM C-30 nicht beeinflusst. Erst bei der höheren Konzentration von 50 µM C-30 wurde nach 10 min Inkubation vor allem die Transkription von 11 und nach 30 min von 33 ribosomalen Proteinen reprimiert.

In Bezug auf die Virulenzregulation wurde die Expression von 23 der 165 potentiellen *P. multocida* Virulenzgene durch 10 µM C-30 reguliert, was 12 % der insgesamt regulierten Gene entsprach. Der Level der Expressionsverän-
derung von Virulenzgene durch die geringe Konzentration der Substanz C-30 lag nicht höher im Vergleich zu den Antibiotika des Referenzkompendi-
ums. Zwei Gene, die für die Protease *clpB* und die Katalase *htkE* kodieren, wurden zu beiden Zeitpunkten durch C-30 induziert. Zwei weitere Gene aus dem Ei-
sentransportsystem (*exbB* und *exbD*) wurden reprimiert (Tab. 23).

Tabelle 23. Virulenzgene differentiell exprimiert bei 10 μ M und 50 μ M C-30 in *P. multocida*.

Gen ID	Annotation	Relative Expressionswerte (log2)			
		10 μ M C-30		50 μ M C-30	
		10min	30min	10min	30min
PM0781	Kapselbiosynthese hexA				-1,62
PM0780	Kapselbiosynthese hexB		-0,74		-2,06
PM0779	Kapselbiosynthese hexC		-0,76		-2,19
PM0778	Kapselbiosynthese hexD				-1,71
PM0774	Kapselbiosynthese hyaE			-0,98	-2,08
PM0773	Kapselbiosynthese phyA		-0,75		-1,43
PM0772	Kapselbiosynthese phyB				-1,08
PM0649	Hämolyisin				0,90
PM1188	Periplasmisches Protein tonB				1,06
PM0400	Eisen-Bindungsprotein yfeA			1,40	2,39
PM0399	Eisen-Bindungsprotein yfeB				0,73
PM1186	Transportprotein exbB	-1,93	-1,39		0,70
PM1187	Transportprotein exbD	-1,68	-1,31		0,81
PM0051	Eisen-Bindungsprotein Precursor fbpA			0,91	2,68
PM0050	Transmembranprotein fbpB				1,04
PM0592	Häm-Bindungsprotein Precursor hbpA	1,57		4,35	5,12
PM1704	Protease clpB	2,74	1,04	5,05	5,25
PM0032	Katalase hktE	2,99	1,77	4,85	3,18

Bei der Regulation der Expression von Virulenzgenen wurde ein dosis- und zeitabhängiger Effekt festgestellt. Insgesamt 99 Virulenzgene von *P. multocida* wurden nach der 30-minütiger Inkubation mit 50 μ M C-30 differentiell exprimiert, was 13 % der insgesamt regulierten Gene entsprach (Tab. A9). Dabei reprimierte C-30 einige wichtige Virulenzgene von *P. multocida*. Dazu zählten die acht Kapselbiosynthese und -transport Gene sowie die Kompetenzgene *comABCDE*, *comM* und *comF* (Tab. 23). Außerdem wirkte C-30 bei höherer Dosierung (50 μ M) und längerer Inkubationszeit (30 min) induzierend auf die Transkription der Virulenzgene *tonB*, *yfeABD*, *fbpAB* und *hbpA*, die im Eisentransport eine wichtige Rolle spielen (Tab. 23). Auffallend war die Regulation der *exbBD* Gene, welche bei der niedrigeren C-30 Konzentration (10 μ M) induziert und bei höheren (50 μ M) reprimiert wurden (Tab. 23).

4 Diskussion

4.1 Referenzkompendium von Antibiotika-induzierten Expressionsprofilen

Zur Behandlung der Enzootischen Bronchopneumonie, einer weltweit verbreiteten und ökonomisch wichtigen Erkrankung von Rindern, wird zurzeit hauptsächlich die antibiotische Therapie eingesetzt (Gründer, 1988; Apley, 1997). Die Hauptverursacher dieser Infektionskrankheit sind die Gram-negativen Bakterien *M. haemolytica* und *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2004a, 2004b). Die Entstehung von Resistenzen und deren potentielle Übertragung auf humanpathogene Erreger bedingt eine Notwendigkeit für die Entwicklung neuer Pharmazeutika in der Tiermedizin (Apley, 1998; Vogel *et al.*, 2001).

Eine wichtige Voraussetzung in dem Entwicklungsprozess neuer Medikamente bzw. Antibiotika ist die Identifizierung geeigneter Angriffspunkte (*targets*). Die Verfügbarkeit der Gemonsequenzen von *M. haemolytica* und *P. multocida* (May *et al.*, 2001, Gioa *et al.*, 2006) eröffnete die Möglichkeit, die im *Drug Discovery* Prozess weit verbreitete *microarray* Technologie-Plattform zu nutzen (Freiberg *et al.*, 2005; Fischer & Freiberg, 2007). Durch das *microarray* Verfahren kann die Genexpression der Bakterien analysiert werden. In dieser Arbeit wurde ein Referenzkompendium erstellt, das die genomweiten Expressionsprofile von Antibiotika-behandelten *M. haemolytica* und *P. multocida* beinhaltet. Dieser Datensatz ermöglichte die Charakterisierung der Antibiotika-spezifischen transkriptionellen Antwort der Bakterien. Es wurden in der vorliegenden Arbeit Antibiotika aus fünf unterschiedlichen Wirkungsklassen untersucht. Aus drei Wirkungsklassen wurden jeweils zwei Antibiotika ausgesucht: Novobiocin und Enrofloxacin als Inhibitoren der DNA Gyrase (Prescott, 1998), Florfenicol und Tilmicosin als Translationsinhibitoren (Prescott, 1998), sowie Trimethoprim und Brodimoprim als Folatbiosynthese Inhibitoren (Prescott, 1998). Zwei weitere Klassen wurden durch einzelne Antibiotika repräsentiert: Cefquinom als Inhibitor der Zellwand Biosynthese und Rifampicin als Inhibitor der RNA Polymerase (Furesz, 1970; Mandell, 1983, Prescott *et al.*, 2000). In der Literatur wurden bisher für keine Substanzen des Referenzkompendiums, außer Enrofloxacin, analoge Untersuchungen in *P. multocida* beschrieben (Nanduri *et al.*, 2006). Bei der Auswertung und der Diskussion der Ergebnisse wurde ein Schwerpunkt auf die Expressionsprofile von *P. multocida* gelegt.

Transkriptomveränderung: bakterizid vs. bakteriostatisch

Die Analysen der transkriptionellen Antwort von *P. multocida* auf die unterschiedlichen Antibiotika ergaben, dass nach Zugabe der bakterizid wirkenden Antibiotika Enrofloxacin und Cefquinom im Gegensatz zu den bakteriostatisch wirkenden Antibiotika weniger Gene differentiell exprimiert wurden. Eine technisch bedingte Ursache für die unterschiedliche Anzahl an regulierten Genen konnte aufgrund der gleichmäßigen RNA Ausbeute und des unveränderten Transkriptionslevels von Kontrollgenen ausgeschlossen werden. Interessanterweise konnte dieser Effekt der bakterizid wirkenden Antibiotika weder in *M. haemolytica* beobachtet, noch wurde er in den in der Literatur veröffentlichten Expressionsstudien beschrieben (Gmünder *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2003, Kaldalu *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). So unterschieden sich beispielsweise die Anzahl der regulierten Gene in *H. influenzae*, einem weiteren Vertreter der *Pasteurellaceae*, durch Novobiocin (bakteriostatisch) und Ciprofloxacin (bakterizid) nicht wesentlich voneinander (Gmünder *et al.*, 2001). Von allen in der Literatur beschriebenen Experimenten waren die Rahmenbedingungen dieser Experimente am ähnlichsten zu den Experimenten in der vorliegenden Arbeit (Gmünder *et al.*, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit auf eine für *P. multocida* spezifische transkriptionelle Antwort auf bakterizid wirkenden Antibiotika hin. Diese kann unter Umständen zur Entwicklung von Spezies-spezifischen Wirkstoffen genutzt werden.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede in der Anzahl der regulierten Genen nach Behandlung mit bakteriostatisch und bakterizid wirkenden Antibiotika könnte der vor kurzem entdeckte *death pathway* sein. Dieser zum Absterben der Zelle führende Metabolismusweg wurde in *E. coli* ausschließlich durch bakterizid wirkende Antibiotika und nicht durch bakteriostatisch wirkende Antibiotika induziert (Kohanski *et al.*, 2007). Zu diesem Stoffwechselweg gehören der TCA Zyklus, der Redoxzyklus des Eisens und die Fenton Reaktion. Der *death pathway* wird durch NADH Abbau ausgelöst. Die nachfolgende Freisetzung des zweiwertigen Eisens (Fe^{2+}) führt zur Produktion von schädlichen Hydroxylradikalen und dadurch letztlich zum Zelltod (Kohanski *et al.*, 2007). Der in der Literatur beschriebene NADH Abbau durch bakterizide Antibiotika wird mit der Induktion der NADH Dehydrogenase I in Zusammenhang gebracht. Die Transkription der für diesen Enzymkomplex kodierenden Gene wurde in *P. multocida* (*pm1329-pm1333*) und *M. haemolytica* (*mh2538-mh2542*) jedoch durch die bakterizid wirkende Antibiotika Enrofloxacin und Cefquinom nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu,

dass der *death pathway* in *P. multocida* keine Rolle spielt und die in dem *pathway* vorhandenen Gene nach der Zugabe von bakteriostatisch wirkenden Antibiotika nicht reguliert werden.

Expression der drug targets

Ein weiteres Ziel diese Arbeit war es zu klären, ob nach Antibiotikazugabe in *P. multocida* die Transkription der jeweiligen Zielproteine beeinflusst bzw. ob charakteristische Transkriptomveränderungen für die einzelnen Antibiotika gefunden werden. Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin und Rifampicin induzierten u. a. die Expression der jeweiligen Zielproteine in *P. multocida*. So wurde in Gegenwart der ribosomalen Inhibitoren Florfenicol und Tilmicosin die Expression einer großen Anzahl ribosomaler Proteine induziert. Eine vergleichbar prägnante Regulation dieser Gene wurde durch die Behandlung mit den anderen Antibiotika im Gegensatz dazu nicht beobachtet. Die Induktion deutet auf eine Kompensation der Inhibierung des Ribosoms durch die vermehrte Transkription ribosomaler Gene hin. Diese Interpretation steht auch im Einklang mit der Regulation ribosomaler Gene durch die Translationsinhibitoren Chloramphenicol und Erythromycin in *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* (Ng *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005). Die beträchtliche Anzahl der bevorzugt induzierten ribosomalen Gene ist ein deutlicher Hinweis auf den Wirkmechanismus der Translationsinhibitoren.

Die Zielproteine von Novobiocin und Enrofloxacin (DNA Gyrase) bzw. Rifampicin (RNA Polymerase) werden nur durch einige wenige Gene kodiert (May *et al.*, 2001; Gioia *et al.*, 2006). Die Transkription der DNA Gyrase Gene *gyrAB* wurde durch Novobiocin in *P. multocida* Antibiotika spezifisch induziert. Der Vergleich mit den Transkriptionsprofilen des Referenzkompendiums zeigte, dass kein weiteres Antibiotikum des Referenzkompendiums die Expression der DNA Gyrase beeinflusste. Weiterhin wurden durch Novobiocin die Topoisomerase I (*topA*) und der Topoisomerase IV (*parEC*) reprimiert. In früheren Untersuchungen in *H. influenzae* wurde der gleiche Effekt von Novobiocin auf die Transkription dieser Gene festgestellt (Gmuender *et al.*, 2001). Dies lässt vermuten, dass diese Transkriptionsveränderungen in Gram-negativen Bakterien spezifisch für Novobiocin sind und als charakteristischer Marker für die Novobiocin Wirkung festgehalten werden kann. Ein zusätzlicher Hinweis auf den MoA von Novobiocin konnte durch die auffallend häufige Regulation der Expression vieler ATPase-Gene in *P. multocida* gefunden werden. Novobiocin inhibiert die Funktionalität der DNA Gyrase durch Bindung an die stark konservierte ATP-Bindestelle der β -Untereinheit GyrB (Lewis *et al.*, 1996). Die

darüber hinaus gehende Bindung von Novobiocin an die konservierte ATP-Bindungsstelle anderer ATPasen ist somit ebenfalls denkbar, so dass die entstehende Inhibition der ATPasen zu einer Regulation der Expression der für die ATPase kodierenden Gene führen könnte. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die Wirkung der Antibiotika nicht nur durch die alleinige Regulierung der Zielgene sondern auch durch die Anpassung der weiteren Stoffwechselwege im bakteriellen Transkriptom reflektiert wird.

Im Gegensatz zu Novobiocin blieb die Transkription der Zielgene *gyrAB* nach der Inkubation mit Enrofloxacin unverändert. Dieser Unterschied zwischen Novobiocin und Ciprofloxacin wurde bereits bei *H. influenzae* beschrieben (Gmuender *et al.*, 2001). Enrofloxacin inhibiert ebenfalls die DNA Gyrase, allerdings, im Gegensatz zu Novobiocin, an dem DNA Gyrase-DNA Komplex. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs, der DNA-Strangbrüche zur Folge hat, ist noch nicht bekannt (Drlica & Zhao, 1997). Durch die DNA-Strangbrüche wird die SOS-Antwort induziert (Drlica & Zhao, 1997). Dabei wird zuerst das Protein RecA aktiviert, welches anschließend den LexA-Repressor spaltet (Abb. 33). Mit dieser Spaltung wird die Transkription der SOS-spezifischer Gene, wie z.B. *lexA*, *recA*, *recX* und *recN* induziert, wodurch die DNA-Reparatur gestartet wird (Abb. 33).

Eine ausgeprägte Induktion der Expression der SOS Gene wurde in *P. multocida* und in *M. haemolytica* nach Zugabe von Enrofloxacin beobachtet. Dieses Ergebnis wurde durch eine Proteom-Analyse in *P. multocida* bestätigt (Nanduri *et al.*, 2006). In der Studie war die Expression von RecA bereits bei Zugabe von $\frac{1}{4}$ x MHK Enrofloxacin um den Faktor 13 induziert (Nanduri *et al.*, 2006). Interessanterweise war die Regulation der SOS Gene in *M. haemolytica* für Enrofloxacin spezifisch, wogegen in *P. multocida* und in *E. coli* (Cirz *et al.*, 2005; Lewin & Amyes, 1991) diese Antwort in geringerem Ausmaß auch durch Rifampicin bzw. Trimethoprim verursacht wurde. Ob diese Antibiotika zur Entstehung von DNA Strangbrüchen beitragen, wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

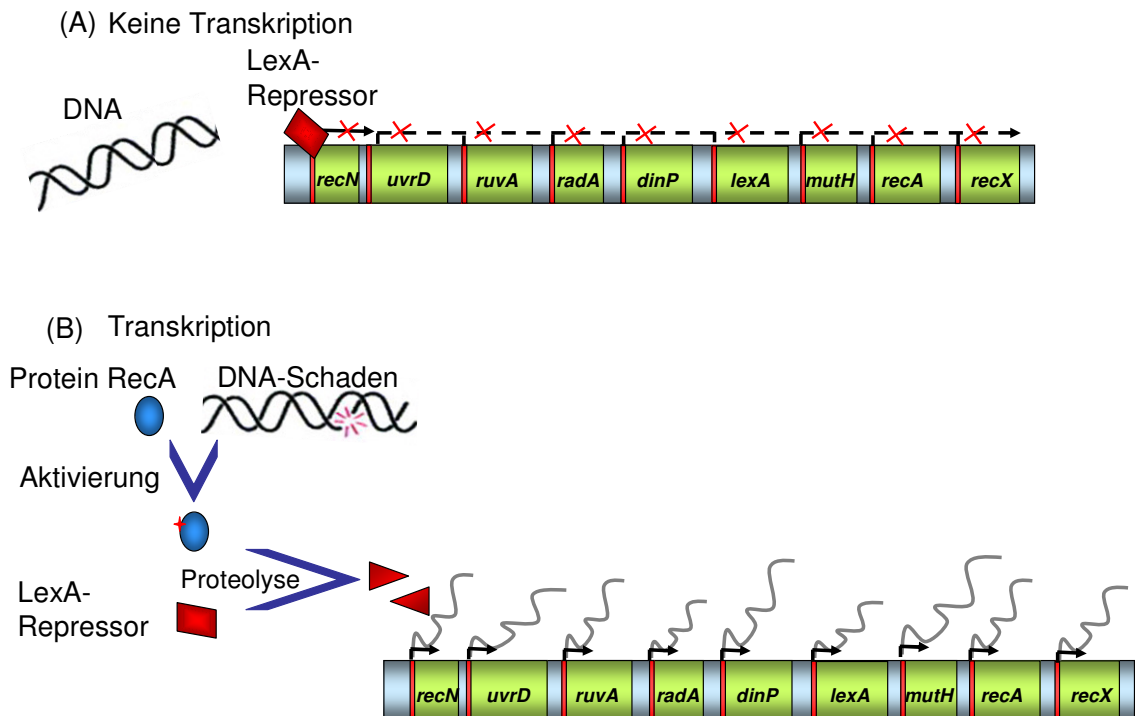


Abb. 33. Die SOS-Antwort in Bakterien. (B) Die DNA Schäden aktivieren das Protein RecA, welches den LexA-Repressor spaltet. Dadurch wird die Transkription der vorher durch den LexA-Repressor reprimierten Gene (A) initiiert.

Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, die SOS-Antwort als einen *target* für eine neue antimikrobielle Substanz zu nutzen. Dabei könnten RecA oder LexA, zwei zentrale Proteine dieses Prozesses, als primäre Zielproteine fungieren. Inhibitoren der SOS-Antwort könnten in Kombination mit Enrofloxacin zur Therapie eingesetzt werden. Der Inhibitor der SOS-Antwort soll bei diesem Ansatz die Reparatur des durch Enrofloxacin entstandenen DNA-Strangbruchs verhindern und so zur Hemmung der Replikation führen. Es wird erwartet, dass dadurch die antimikrobielle Wirkung von Enrofloxacin verstärkt wird (Shaw *et al.*, 2003; Kaldalu *et al.*, 2004).

Die durchgeführten Analysen des Referenzkompendiums zeigten, dass die Expression der beiden RNA Polymerase Untereinheiten *rpoB* und *rpoC* durch den RNA Polymerase Inhibitor Rifampicin in *P. multocida* induziert wurde. Darüber hinaus regulierte Rifampicin die Expression weiterer Proteine, die an der Transkription beteiligt sind. Induziert wurde die Transkription der Sigmafaktoren σ^{70} und σ^E , die durch die Gene *rpoD* und *rpoE* kodiert sind, sowie deren putative Aktivatoren ResB, PM0092 und PM0178. Die transkriptionelle Antwort von *E. coli* auf Rifampicin zeigte ebenfalls eine Induktion der Expression von *rpoB* (Shaw *et al.*, 2003). Die Regulation der *rpoB* Expression

scheint jedoch nicht für Rifampicin spezifisch zu sein, da auch Novobiocin die Transkription von *rpoBC* und einiger Sigmafaktoren in *P. multocida* induzierte.

Zwei weitere Substanzen des Referenzkompendiums, Trimethoprim und Brodimoprim, inhibieren die Folatbiosynthese, die wichtige Zwischenprodukte für die Synthese der Purine Adenosin und Guanosin liefert (Then & Hermann, 1984; Quinlivan *et al.*, 2000). Die früheren Untersuchungen der Trimethoprim-induzierten Expressionsprofile des Gram-positiven Bakteriums *B. subtilis* zeigen, dass die zum Purinbiosynthese-Stoffwechselweg gehörenden Gene durch Trimethoprim induziert wurden (Freiberg *et al.*, 2006). Dieser Effekt konnte bei den beiden hier getesteten Gram-negativen Bakterien *P. multocida* und *M. haemolytica* nicht beobachtet werden. Die Transkription des Zielgens *folB*, welches für die Dihydrofolat-Reduktase kodiert, wurde durch Trimethoprim und Brodimoprim nicht beeinflusst. Ebenso lieferten die Expressionsprofile nach der Zugabe beider Antibiotika im *P. multocida* keine direkten oder indirekten Anhaltspunkte zum Wirkmechanismus. Zur antimikrobiellen Therapie werden diese Antibiotika oft mit Analoga der para-Aminobenzoessäure (Sulfonamide wie Sulfamethoxazol) kombiniert, die die mikrobielle Dihydropteroat-Synthase und damit gezielt die mikrobielle Folsäuresynthese hemmen (Vogel *et al.*, 2001). Die Expressionsprofile dieser Antibiotika, eventuell in Kombination mit Trimethoprim und Brodimoprim könnten mehr Informationen über die Wirkung der Hemmung dieses Stoffwechselwegs auf das Transkriptom und auf die zellulären Prozesse von *P. multocida* und *M. haemolytica* liefern.

Cefquinom, ein Inhibitor der Zellwand-Biosynthese regulierte die Transkription der bekannten Zielgene (Transpeptidase) in *P. multocida* nicht. In früheren Arbeiten wurde auch in *E. coli* keine Regulation dieser Gene während der Inkubation mit anderen β -Laktamen gefunden (Shaw *et al.*, 2003; Kaldalu *et al.*, 2004). Allerdings wurden einigen Transpeptidasen unabhängig vom MoA durch Novobiocin, Florfenicol und Trimethoprim reguliert. Dies zeigt, dass die Transpeptidasen nicht *per se* unreguliert exprimiert werden. Ähnlich wie bei den Folatbiosynthese-Inhibitoren, Trimethoprim und Brodimoprim, wurden auch bei β -Laktam, Cefquinom, keine weiteren charakteristischen Transkriptom-Änderungen bzw. Signaturgene gefunden. Um diese sicher zu identifizieren müssen zusätzliche *microarray*-Experimente mit weiteren β -Laktamen analysiert werden (Freiberg *et al.*, 2004; Hutter *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung einzelner Zielproteine Veränderungen in den entsprechenden Stoffwechselwegen verursa-

chen, die sich unterschiedlich auf den gesamten Metabolismus in der Zelle auswirken. Die Proteinbiosynthese ist beispielsweise ein zentraler Prozess in der Zelle, der aus den zwei Teilprozessen Transkription und Translation besteht. Die Hemmung einer der beiden Teilprozesse führt zu einer globalen Verschiebung der Genexpression. Die RNA-Polymerase ist ein Enzym, das aus vier Untereinheiten besteht und wesentlich an der Transkription beteiligt ist. Die Inhibierung dieses Enzyms durch Rifampicin löste einen deutlich ausgeprägten Effekt auf das Transkriptom von *P. multocida* aus. Ca. 30 % des Genoms wurden differentiell exprimiert. Nach der Transkription folgende Translation erfolgt an Ribosomen, die sich aus zwei Untereinheiten (30S und 50S) zusammensetzen. Die große Untereinheit wird aus 34 Proteinen und zwei RNA-Moleküle gebildet. Die Inhibierung des Ribosoms durch die Translationshemmer verursacht bei *P. multocida* zum einen die Induktion von mehr als 30 % der ribosomalen Gene, zum anderen führt die Hemmung zu einer Verschiebung des gesamten zellulären Metabolismus'. Die Expression bis zu 30 % aller *P. multocida* Gene wurde durch Florfenicol- bzw. Tilmicosin-Zugabe reguliert. Analoge Ergebnisse wurden auch bei anderen Mikroorganismen (z. B. *E. coli*, *H. influenzae*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*) gefunden (Freiberg *et al.*, 2004).

Referenzkompendium cluster-Analyse

Die in dieser Arbeit gewonnenen Expressionsprofile des Referenzkompendiums bilden die Grundlage für die Charakterisierung der MoAs neuer antimikrobieller Substanzen. Die hierarchische *cluster*-Analyse der Expressionsprofile der Substanzen des Referenzkompendiums zeigt, dass Antibiotika mit gleichen bzw. verwandten Wirkmechanismen eine ähnliche Regulation der Genexpression bewirken. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bei anderen Mikroorganismen (z.B. *E. coli*, *H. influenzae*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*) (Freiberg *et al.*, 2004; Hutter *et al.*, 2004, Freiberg *et al.*, 2006). Die untersuchten Antibiotika-behandelten *P. multocida* Expressionsprofile wurden in fünf separate Gruppen eingeteilt, wobei die beiden Zeitpunkte einzelner Substanzen jeweils zusammen gruppiert wurden. Außerdem erfolgte die Gruppierung der Profile der Translationsinhibitoren in ein *Subcluster*, sowie die Einteilung der Novobiocin- und Enrofloxacin-induzierten Expressionsprofile in zwei separate Gruppen. Es konnte somit nicht nur die verschiedenen Wirkmechanismen (wie z.B. Translationsinhibitoren gegen Inhibitoren der Zellwand-Biosynthese) voneinander differenziert werden, sondern auch unterschiedliche Angriffsorte beim gleichen Zielprotein, wie beispielsweise bei den DNA Gyrase Inhibitoren, erkannt werden. Dieses Ergeb-

nis weist auf eine individuelle Anpassung der Bakterien auf die spezifischen Effekte unterschiedlicher MoAs der getesteten Antibiotika. Die bereits publizierten Expressionsprofil-Untersuchungen in *H. influenzae*, *S. pneumoniae* bzw. *B. subtilis* bestätigen dies (Gmuender *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2003; Hutter *et al.*, 2004).

Referenzkompendium fingerprint-Analyse

Weiterführende Analyseschritte, wie *fingerprint*-Analysen und die Identifizierung von Signatur- und Stressgenen (*heat shock*), vertieften das Verständnis der Antibiotika abhängigen Transkriptomveränderungen in *P. multocida*. So wurden drei funktionelle Gruppen, deren Gene durch alle Antibiotika beeinflusst wurden, mittels der *fingerprint*-Analysen identifiziert. Dazu zählen der Energiestoffwechsel, verschiedene Transport- und Bindeproteine, sowie Stressproteine, wie Chaperone, Peptidasen und Isomerasen. Außerdem wurde die Expression von zwei Chaperonen, GroES (PM1106) und HtpG (PM1024), durch alle Antibiotika des Referenzkompendiums reguliert. Die restlichen funktionellen Gruppen wurden durch einzelne Antibiotika in unterschiedlichem Ausmaß reguliert. Das zeigte, dass neben den funktionellen Gruppen, die unabhängig von den Wirkmechanismen der Antibiotika beeinflusst wurden, die Bakterien ansonsten spezifisch auf die einzelnen Antibiotika reagieren.

Referenzkompendium Signaturgene

Ferner wurden in dieser Arbeit die *P. multocida* Signaturgene, die für jedes einzelne Antibiotikum des Referenzkompendiums spezifisch zu beiden Zeitpunkten reguliert waren, identifiziert. Das Signaturgen für Novobiocin war das für die DNA Gyrase kodierende Gen (*gyrAB*). Die Zielgene der Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin, die für ribosomale Proteine kodieren, wurden als charakteristisch für diese beiden Antibiotika ermittelt. Für Enrofloxacin gilt *recA* als eines der Signaturgene, was im Einklang mit früheren Untersuchungen steht (Nanduri *et al.*, 2006). Bei zukünftigen Forschungsarbeiten können, ähnlich wie in anderen Bakterien (Freiberg *et al.*, 2006), die in dieser Arbeit identifizierten Signaturgene für die Charakterisierung neuer Substanzen verwendet werden.

Transkriptomveränderungen M. haemolytica vs. P. multocida

Der Vergleich der Antibiotika-induzierten Transkriptionsprofile von *M. haemolytica* mit den Expressionsprofilen von *P. multocida* ergab nur wenige Übereinstimmungen. So wurde die Transkription der meisten

M. haemolytica Gene durch Novobiocin, Florfenicol und Tilmicosin beeinflusst. Wobei bei *P. multocida* auch Rifampicin, Trimethoprim und Brodimoprim eine ähnlich große Anzahl der Gene regulierten. Im Gegensatz zu *P. multocida* wurde zwischen den Expressionsprofilen von bakterizid und bakteriostatisch wirkenden Antibiotika in *M. haemolytica* kein eindeutiger Unterschied gefunden. So regulierten die bakterizid wirkenden Antibiotika Cefquinom (34 Gene) und Enrofloxacin (14 Gene) eine ähnliche Anzahl an Genen wie die bakteriostatisch wirkenden Antibiotika Rifampicin (33 Gene) und Brodimoprim (18 Gene).

Die Einteilung der *M. haemolytica* Expressionsprofile des Referenzkompendiums in *cluster* entsprach der erwarteten Gruppierung nach MoAs nur zum Teil. Die einzelnen Expressionsprofile wurden in mehrere unterschiedliche *cluster* unterteilt. Beispielsweise wurden die beiden Zeitpunkte der Tilmicosin-Behandlung nicht zusammen gruppiert. Die Expressionsprofile von Trimethoprim und Brodimoprim bildeten ebenfalls kein gemeinsames *cluster*. Dieses Ergebnis zeigt die Notwendigkeit ein eigenes Referenzkompendium für beide Erreger zu erstellen. Weiterhin ist es erforderlich, das Referenzkompendium mit Expressionsprofilen weiterer Antibiotika zu erweitern, um aussagekräftigere Ergebnisse aus der *cluster*-Analyse zu erhalten.

Bei der Untersuchung der Auswirkung der Antibiotika auf die Expression der für die Zielproteine kodierenden Gene wurde gefunden, dass die Zielgene mit nur einer Ausnahme in beiden Erregern gleich reguliert wurden. Novobiocin induzierte auch in *M. haemolytica* die DNA Gyrase, und die Transkriptionssinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin induzierten die Expression von über 20 % der für die ribosomalen Proteine kodierende Gene. Ebenso wie in *P. multocida*, regulierten Enrofloxacin, Trimethoprim, Brodimoprim und Cefquinom die entsprechenden Zielgene in *M. haemolytica* nicht. Die einzige Ausnahme stelle die Expression von *rpoB* dar. Das Gen wurde in *M. haemolytica* nach Zugabe von Rifampicin nicht differentiell exprimiert, während die Expression in *P. multocida* nach der Zugabe induziert wurde.

Die *fingerprint*-Analyse zeigte, dass die Expression von Gene aus drei funktionellen Gruppen, die mit regulatorischen Funktionen, die der DNA- & Nukleotidmetabolismus-Gruppe und die der Transport- und Bindeproteine Gruppe, bei beiden Erregern durch fast alle Antibiotika beeinflusst wurden. Außerdem führten Florfenicol, Tilmicosin, Novobiocin und Enrofloxacin in beiden Bakterien zu ähnlichen *fingerprints*. Neben diesen Gemeinsamkeiten wurden jedoch in *P. multocida* und *M. haemolytica* auch Unterschiede zwi-

schen den Expressionsprofilen gleicher Antibiotika mittels *fingerprint*-Analysen gefunden. Dies ist bemerkenswert, da beide Spezies zur Gattung *Pasteurellaceae* gehören. So unterschieden sich die *fingerprints* der restlichen vier Antibiotika des Referenzkompendiums bei beiden Bakterien deutlich. Ein weiterer Vergleich der Expressionsprofile zeigte, dass bei beiden Erregern nicht die gleichen Signaturgene für dieselben Antibiotika gefunden wurden. Das Zielprotein des Novobiocins, die DNA Gyrase, zählte in *M. haemolytica* nicht zu den Signaturgenen dieser Substanz. Bei Trimethoprim-, Brodimoprim- und Rifampicin-induzierten Expressionsprofilen unterschieden sich die Signaturgene deutlich. Zusammenfassend lassen die hier gewonnenen Daten den Schluss zu, dass die Differenzen zwischen den Transkriptomveränderungen von *M. haemolytica* und *P. multocida* die Spezies-spezifischen Besonderheiten der Erreger widerspiegeln. In wie weit diese Spezies-spezifischen Besonderheiten zu Virulenz der Erreger beitragen ist unbekannt. Die Unterschiede in den Transkriptionsprofilen zeigen zudem die unterschiedliche Empfindlichkeit von *M. haemolytica* und *P. multocida* auf die Antibiotika-Therapie, was sich auch im Resistenzprofil der Erreger reflektiert. So waren in einer Literaturstudie mehr *M. haemolytica* Isolate gegen Sulfonamide und Sulfamethoxazol/Trimethoprim sensitiv, wohingegen bei *P. multocida* mehr Isolate gegen Ampicillin und Penicillin sensitiv waren (Hörmansdorfer & Bauer, 1996). Daraus folgend sollte für künftige Charakterisierungen neuer Substanzen der Wirkmechanismus bei beiden Erregern untersucht werden.

Zahlreiche Expressionsstudien wurden zur Charakterisierung der Antibiotika-induzierten Transkriptionsänderungen publiziert, so z.B. in Mykobakterien, den Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis*, bzw. den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *H. influenzae* (Gmünder *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2003, Boshoff *et al.*, 2004; Hutter *et al.*, 2004; Kaldalu *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). Der Vergleich der Forschungsergebnisse dieser Arbeit mit den oben benannten publizierten Studien zeigte kaum Übereinstimmung bezüglich der Regulation einzelner Gene unter gleichen bzw. ähnlichen Rahmenbedingungen. Beispielsweise wurde bei *S. pneumoniae* durch die Translationsinhibitoren die Transkription der *pur*-Gencluster induziert, die für die Purinbiosynthese kodieren (Ng *et al.*, 2003), wogegen bei *M. haemolytica* und *P. multocida* diese Gene kaum beeinflusst wurden. Die größte Übereinstimmung der regulierter Gene wies die Expressionsstudie von Novobiocin und Ciprofloxacin behandelten *H. influenzae*, einem weiteren Vertreter der *Pasteurellaceae*, auf (Gmünder *et al.*, 2001). Die ge-

fundenen Unterschiede zu den publizierten Studien zeigen die Bedeutung dieser Arbeit. Da die Antibiotika-induzierten Transkriptionsveränderungen für die Erreger spezifisch sind, können keine Literaturdaten zur Charakterisierung neuer Wirkstoffe in *P. multocida* und *M. haemolytica* herangezogen werden. Grundlage für eine solche Analyse können nur die Ergebnisse dieser Arbeit sein.

Die gesamten Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die *microarray* Technologie als eine schnelle und präzise Technologie zu bewerten, die viele neue Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Therapieansätze liefert. Zum einen könnte durch die *microarray* Technologie die Anpassung der Stoffwechselwege, welche die Antibiotika-Effekte im Bakterium kompensieren, identifiziert werden. Zum anderen könnte der antibiotische Effekt von aktiven Substanzen erklärt werden, der über die Inhibition des Zielproteins hinausgeht, indem z.B. die spezifisch durch Antibiotika reprimierten Metabolismuswege gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten aber auch die Grenzen der *microarray* Technologie. So ergaben einige Expressionsprofile von *P. multocida* und *M. haemolytica* keine eindeutigen Anhaltspunkte auf den Wirkmechanismus der getesteten Antibiotika. Dazu zählen die Antibiotika Trimethoprim, Brodimoprim und Cefquinom. Die Enrofloxacin-induzierten Expressionsprofile lieferten nur einen indirekten, durch die Induzierung der SOS Antwort, vermittelten Hinweis auf den Wirkmechanismus. Durch diese Erkenntnisse können neue Vorschläge über innovative Zielproteine bzw. neue Zielstoffwechselwege entwickelt werden. Die Wirkung neuer Antibiotika auf nachgeschaltete Stoffwechselwege kann eine denkbare Kombination an effektiveren Therapiemöglichkeiten mit geringerem Risiko zur Resistenzentwicklung darstellen. Einen weiteren zukunftsorientierten Ansatz für neue Therapiemöglichkeit stellen die Inhibitoren der Virulenzfaktoren dar. Insbesondere die Substanzen, die eine Wirksamkeit auf die Transkription der Virulenzgene besitzen, können durch *microarray* Analyse identifiziert werden und bevorzugt zu neuen Therapeutika entwickelt werden. Des Weiteren ermöglichen die mit Hilfe von *microarrays* identifizierten *targets* und Signaturgene, die für MoA repräsentativ sind, eine weitgehend präzise MoA Einschätzung neuer Wirkstoffe.

4.2 Auswirkungen der Antibiotika auf die Expression der Virulenzgene

Eine bakterielle Infektionserkrankung ist ein dynamischer Prozess, wobei die Interaktion zwischen einem pathogenen Organismus und einem Wirtsorganismus eine entscheidende Rolle spielt. Zur Kolonisierung und zum Ausschalten der unspezifischen Wirtsabwehr sind Virulenzfaktoren wie Toxine, Kapsel und Adhäsine beteiligt (Schimmel *et al.*, 1992; Highlander, 2001; Yeyaseelan *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003; Zecchinon *et al.*, 2005; Taylor & Roberts, 2005; Harper *et al.*, 2006). Weitere Virulenzfaktoren, wie beispielweise eisenbindende Proteine, schaffen die Voraussetzungen zur Vermehrung und der Proliferation der Bakterien im Wirt ohne direkte Schädigung der Wirtszellen. Für die Entwicklung neuer Antibiotika sind deshalb neben den klassischen essentiellen Proteinen, die für das Überleben der Erreger wichtig sind, auch die Virulenzfaktoren, die direkt oder indirekt an der Etablierung einer Infektion beteiligt sind, von Interesse (Galperin & Koonin, 1999).

Die Auswertung der Expressionsprofile des Referenzkompendiums zeigte einen beachtlichen Einfluss einzelner Antibiotika auf die Transkription der Virulenzfaktoren. Alle Antibiotika des Referenzkompendiums wirkten reprimierend auf die Transkription der vielen *P. multocida* Virulenzgene. Die Mehrzahl der Virulenzgene (zwischen 30 und 48) wurde von Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin und Trimethoprim reguliert. Im Gegensatz dazu wurde die Transkriptomveränderung der Virulenzgene in *M. haemolytica* nur durch einige wenige Antibiotika verursacht. Nur Novobiocin, Florfenicol und Tilmicosin beeinflussten, meistens reprimierend, eine große Anzahl an *M. haemolytica* Virulenzgenen (zwischen 18 und 30). Diese Ergebnisse weisen auf eine generelle Inhibierung der Virulenzfaktoren durch Antibiotika in *P. multocida* hin.

Einen ähnlichen Einfluss auf Virulenzgene zeigten einige Antibiotika in anderen Bakterien (Shryock *et al.*, 1998; Diarra *et al.*, 1999). So reprimierte Polymyxin in *Salmonella enterica* (Serovar Typhimurium) die Gene, die für Invasionsproteine und Flagellen kodieren (Bader *et al.*, 2003). Azithromycin beeinflusste negativ das *quorum sensing* und die Biofilmbildung in *Pseudomonas aeruginosa* (Nalca *et al.*, 2006). Eine signifikante Reduktion der hämolytischen Aktivität durch Tylosin und Apramycin wurde in *Actinobacillus pleuropneumoniae* beobachtet (Diarra *et al.*, 1999). Außerdem wirkten diese Antibiotika negativ auf die Fähigkeit der Kapselbildung von *A. pleuropneumoniae* und *P. multocida*. In der vorliegenden Arbeit wurde ein negativer Effekt auf die

Transkription der Kapselgene in *P. multocida* durch Novobiocin, Florfenicol, Tilmicosin, Brodimoprim und Trimethoprim identifiziert. Das Kapselgen-cluster PM0772-PM0781 von *P. multocida* besteht aus zehn Genen, welche in drei Regionen eingeteilt sind (Abb. 37) (Boyce *et al.*, 2000b). Region 1 beinhaltet vier ORFs, *hexA*, *hexB*, *hexC* und *hexD* (*hex* für *hyaluronic acid export*) (Chung *et al.*, 1998). Diese Gene kodieren für Proteine, die einen Komplex für den Polysaccharid-Export zur Zelloberfläche bilden. Zur Region 2 gehören vier Gene *hyaE*, PM0775-PM0777, die an der Zuckermonomer-Aktivierung und der Bildung der Polymere beteiligt sind (Chung *et al.*, 1998). Region 3 besteht aus zwei Genen *phyA* und *phyB* (*phy* für *phospholipid substitution of hyaluronic acid*), die in entgegengesetzter Richtung zur Region 1 und 2 transkribiert werden (Chung *et al.*, 1998). Die Proteine PhyA und PhyB sind vermutlich für die Anheftung von Phospholipiden an die Kapsel-Polysaccharide verantwortlich (Chung *et al.*, 1998).

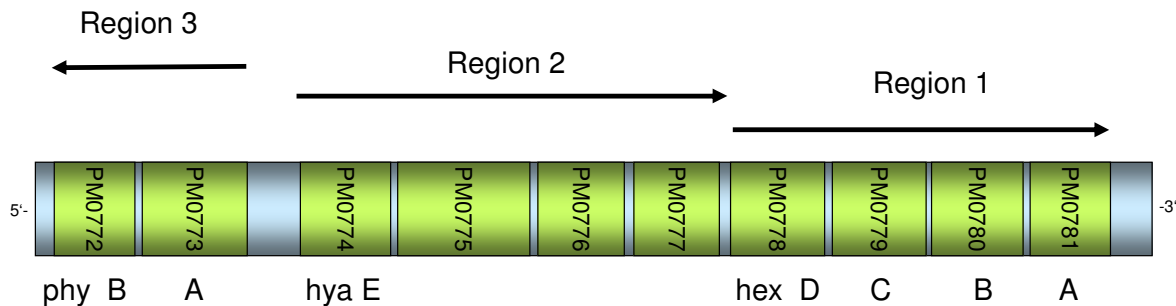


Abb. 34. Operonstruktur von Kapselgenen in *P. multocida*. Anordnung des Kapselgen-clusters PM0772-PM0781 auf dem Chromosom von *P. multocida*. Promoterregionen sind mit Pfeilen angezeigt. Die zehn Gene werden in drei Regionen eingeteilt (Chung *et al.*, 1998).

Die Bedeutung der Kapsel für die Virulenz von *P. multocida* wurde in den letzten Jahren eindeutig bestätigt (Boyce & Adler, 2000; Chung *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2006). Unter *in vitro* Subkultivierung verliert *P. multocida* Serotyp A spontan die Kapsel. Sobald diese Bakterien wieder im Tier zu einer Infektion führen, sind sie wieder von einer Kapsel umhüllt, was einen direkten Zusammenhang zwischen der Virulenz von Bakterien und deren Kapsel erkennen lässt (Heddleston *et al.*, 1964; Watt *et al.*, 2003). *P. multocida* Stämme ohne Kapsel waren in der Maus nicht virulent (Jacques *et al.*, 1993). Ebenso führte eine *knock-out* Mutation von dem Kapseltransportgen *hexA* in *P. multocida* zur Virulenzabschwächung (Chung *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser essentiellen Rolle der Kapsel für die Virulenz der Bakterien wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht, welche Konsequenzen die Reprimierung der Kapselgene durch Antibiotika auf die Fähigkeit der Kap-

selbildung hat. Für diese Versuche wurde *P. multocida* mit der halben MHK von Novobiocin, Florfenicol und Trimethoprim inkubiert. Die $\frac{1}{2}$ x MHK wurde verwendet, um das Wachstum der Bakterien nicht vollständig zu hemmen. Bei dieser Konzentration verursachten Novobiocin und Trimethoprim eine stark ausgeprägte Verringerung der Kapsel auf der Oberfläche von *P. multocida*. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch bei subinhibitorischen Konzentrationen im Gewebe, diese Antibiotika die Virulenz von *P. multocida* unterdrücken können. Allerdings aufgrund des höheren Risikos der Resistenzentwicklung bei sub-MHK wird von der Verwendung dieser geringen Antibiotika Konzentrationen in der Therapie abgesehen (Apley, 1998; Cusack *et al.*, 2003; Catry *et al.*, 2005; Werckenthin *et al.*, 2005; Schwarz & Kehrenberg, 2006). Im Fall von Florfenicol führte die Inkubation mit dieser Substanz, trotz der Reprimierung der Transkription der Kapselgene, zu keinem signifikanten Effekt auf die Ausbildung der Kapsel bei *P. multocida*. Die Expressionsprofile der drei Antibiotika Novobiocin, Trimethoprim und Florfenicol unterschieden sich nur in der Regulation zweier Gene *phyA* und *phyB*, welche in der Kapselbiosynthese beteiligt sind (Chung *et al.*, 1998). Diese Gene wurden durch Florfenicol nicht reprimiert. Ob das die Ursache für das Ausbleiben des Effekts auf die Fähigkeit der Kapselbildung und auf die Zellmorphologie von *P. multocida* ist, wäre noch mit den *knock-out* Mutanten von den einzelnen Kapselgenen zu klären.

Der Regulationsmechanismus der Expression von Kapselgenen in *P. multocida* ist bisher noch nicht erforscht worden. Vermutlich wird die Expression durch ein Aktivatorprotein reguliert, das möglicherweise mit verschiedenen Substanzen auf noch unbekannte Weise reagiert. Daraus resultierende substanzspezifische Effekte wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt und sollten in den zukünftigen Arbeiten genauer untersucht werden.

In den vergangenen Jahren wurden mehrere äußere Membranproteine als Eisenakquirierungssysteme bei Pasteurellen identifiziert und beschrieben (Kirby *et al.*, 1998; Ewers *et al.*, 2004; Röhrig *et al.*, 2007). TonB liefert die Energie für den Transport des Eisens und als Eisenquellen fungieren Eisenbindende Moleküle wie Transferrin, Laktoferrin, Hämoglobin und andere (Ratledge & Dover, 2000; Bosch *et al.*, 2002a, Bosch *et al.*, 2002b). Eisenbindende Proteine zählen zu den wichtigsten Virulenzfaktoren und ihre Expression wird nach Eintritt des Bakteriums in den Wirt induziert. Dadurch werden die im Gewebe vorhandenen Eisenmangelbedingungen ausgeglichen und der Eisenbedarf der Bakterien gedeckt. Diese Überexpression der Eisenbindenden Proteine trägt bereits in der frühen Phase der Infektion zur Per-

sistenz des Erregers bei. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass vor allem die beiden Translationsinhibitoren Florfenicol und Tilmicosin die Expression von mehreren Eisenaufnahmesystemen von *M. haemolytica* (FbpABC, FrpB) und *P. multocida* (ExbBD, FbpA, Häme-Eisen Aufnahmeprotein, TonB-Komplex) reprimieren.

Ein Zusammenhang zwischen der Repression dieser Eisengene und der daraus resultierenden Einschränkung der Eisenaufnahme könnte sich möglicherweise in der Hemmung des Bakterienwachstums auswirken. In den *in vitro* Wachstumsversuchen unter den eisenlimitierenden Bedingungen und in Gegenwart unterschiedlicher Eisenquellen hatten die Antibiotika keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten von *P. multocida* und *M. haemolytica*. Dadurch ist ein Zusammenhang zwischen der Reprimierung der Expression verschiedener Eisentransporter einerseits und der Eisenaufnahme bei beiden Bakterien andererseits unwahrscheinlich.

Aus diesem Ergebnis können zwei Hypothesen aufgestellt werden. Zum einen, da nicht alle Eisenaufnahmesysteme generell reprimiert wurden, könnten die Bakterien durch die im vollen Umfang transkribierten Transporter, wie HmbR, YfeABCD bzw. TbpAB weiterhin mit Eisen versorgt werden. Zum anderen, übte die zweifache Reprimierung der meisten Eisengene vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Proteinmenge der Eisentransporter aus, so dass der Eisentransport vermutlich nicht essentiell gemindert wurde.

In der Arzneimittelentwicklung spielen die Virulenzfaktoren als Zielproteine für neue Wirksubstanzen eine zunehmende Rolle (Marra *et al.*, 2004). Die essentielle Rolle der Eisenakquirierungssysteme von *M. haemolytica* und *P. multocida* in der Proliferation und der Virulenz beider Bakterien machen diese Proteine zum potentiellen Angriffspunkt für neue Antibiotika. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine mögliche Kompensation der Inhibierung eines Transportes durch andere Eisentransporter hin. Dieser Sachverhalt macht die Entwicklung einer wirksamen Substanz mit diesem Wirkmechanismus schwierig. Diese Substanz sollte entweder alle Transporter des Eisenakquirierungssystems hemmen oder ein Schlüsselenzym der Eisenaufnahme inhibieren.

Eine Induktion der Virulenzgene durch die Antibiotika des Referenzkompendiums wurde in *P. multocida* und *M. haemolytica* kaum beobachtet. Nur Rifampicin und Novobiocin induzierten einige Virulenzgene in *P. multocida*, sowie Florfenicol und Tilmicosin einige Virulenzgene in *M. haemolytica*. In der Literatur wurde ein stimulierender Effekt auf die Virulenz generell viel seltener

beobachtet als die Reprimierung der Virulenzgene durch Antibiotika. So induzierten beispielsweise mehrere Antibiotika (Tobramycin, Tetracycline, und Norfloxacin) in *Pseudomonas aeruginosa* die Biofilm-Formation und die Type III Sekretion (Linares *et al.*, 2006).

4.3 Die Transkriptomveränderung durch Thiazin

Die antibiotisch wirksame Substanz aus der Gruppe der Thiazine wirkte gut gegen *M. haemolytica* und *P. multocida* mit geringen MHK Werten und hat kaum einen Effekt auf *E. coli*. Das Thiazin enthält den charakteristischen Ring aus vier Kohlenstoffatomen, einem Stickstoff- und einem Schwefelatom. Der Wirkmechanismus des Thiazins ist noch nicht charakterisiert. Weitere Substanzen dieser Klasse, wie z. B. Phenothiazine, werden als Antihistaminika eingesetzt und werden dementsprechend nicht zu den Antibiotika gezählt. Interessanterweise wirken Phenolthiazine antibiotisch auf eine Reihe von Bakterienstämmen, wobei der Wirkmechanismus nicht bekannt ist (Kristiansen & Amaral, 1997, Chan *et al.*, 2007).

Die Thiazin-induzierten Expressionsprofile von *P. multocida* und *M. haemolytica* wurden nach dem Standardprotokoll mittels *microarray* aufgenommen und lieferten erste Anhaltspunkte zur Charakterisierung des Wirkmechanismus'. Außerdem wurde ein Vergleich zwischen diesen Profilen und dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Referenzkompendien durchgeführt. Dieser ergab allerdings kaum Kongruenz. Bei der *cluster*-Analyse für beide Bakterien wurden die Thiazin-induzierten Expressionsprofile in separate *cluster* Gruppen eingeteilt. Die *fingerprint*-Analysen zeigten minimale Ähnlichkeiten mit den *fingerprints* der acht Substanzen des Referenzkompendiums. Die identifizierten Signaturgene und Zielgene der Antibiotika des Referenzkompendiums wurden durch Thiazin ebenfalls nicht reguliert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Thiazin einen anderen Wirkmechanismus als die der acht Substanzen des Referenzkompendiums aufweist.

Zusätzlich zu diesen Analysen wurden aufgrund der guten Wirksamkeit von Thiazin gegen beide Erreger *P. multocida* und *M. haemolytica* die Thiazin-induzierten Expressionsprofile von beiden Organismen miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass Thiazin in *M. haemolytica* fünffach mehr Gene als in *P. multocida* regulierte. Darunter waren 35 Gene, welche für Eisentransportproteine wie FbpAB, TbpAB, HmbR, YfeABCD und der TonB-Komplex kodierten, die in *M. haemolytica* aber nicht in *P. multocida* induziert wurden. Eine ähnliche Regulierung der Eisengene wurde bereits bei *M. haemolytica* unter

Eisenmangel festgestellt (Röhrig *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse waren ausschlaggebend zur Aufstellung der ersten Hypothese über den Wirkmechanismus von Thiazin. Diese besagt, dass die antimikrobielle Wirkung von Thiazin möglicherweise in der Komplexbildung von Eisen und der daraus folgenden Hemmung des Bakterienwachstums aufgrund von Eisenmangel liegt. Angenommen diese These trifft zu, dann sollte die hemmende Wirkung von Thiazin auf das Bakterienwachstum durch die Zugabe zusätzlicher Eisenquellen in das Medium zumindest gemindert werden. Allerdings konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Weder der MHK-Wert noch das Wachstumsverhalten von *M. haemolytica* bzw. von *P. multocida* änderte sich in Abhängigkeit vom Eisengehalt im Medium. Obwohl diese erste Hypothese nicht bestätigt wurde, bleibt weiterhin interessant zu erforschen, warum so viele Eisentransporter in *M. haemolytica* durch Thiazin induziert wurden.

Ferner ergab die Analyse der Transkriptionsregulation von orthologen Genen in *M. haemolytica* und *P. multocida* eine Schnittmenge von 18 orthologen Genen, welche Thiazin in beiden Erregern induzierte. Die meisten davon kodierten für Stressproteine, während die restlichen Gene für Proteine mit Funktionen in der Aminosäurebiosynthese und Zellstruktur sowie für hypothetische Proteine kodierten. Die annotierten Proteine aus dieser Liste wurden bisher nicht als Zielproteine für bekannte Antibiotika beschrieben. Darüber hinaus könnte die eindeutige Annotation und die Charakterisierung der restlichen Proteine mehr Aufschluss über den Wirkmechanismus von Thiazin geben. In der Gesamtheit stellen diese ersten Erkenntnisse über die Auswirkung der antibiotisch wirksamen Substanz Thiazin auf die Transkriptome von *M. haemolytica* und *P. multocida* einen ersten Schritt zur genaueren Charakterisierung des Wirkmechanismus dar und deuten auf ein mögliches neues Zielprotein hin, das in der Arzneimittelentwicklung noch nicht bekannt ist.

4.4 Die Transkriptomveränderung durch C-30

Insbesondere auf dem Gebiet der antibakteriellen Therapeutika wird den Naturstoffen auf der Suche nach besseren Wirkstoffen große Bedeutung zugeschrieben (Alksne & Dunman, 2008). Furanone sind Naturstoffe, die aus der Alge *Delisea pulchra* isoliert werden. Sie hemmen das Wachstum der Grampositiven Bakterien (Ren *et al.*, 2004b). Auf das Wachstum der Gramnegativen Bakterien wurde dagegen kein Effekt festgestellt, obwohl eine Inhibierung von multizellulären Verhaltensweisen, wie Biofilmbildung und Biolumineszenz, beobachtet wurde (Ren *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2004a). Ein

synthetisches Furanon zeigte in *P. aeruginosa* eine Hemmung der Expression von 80 % der Proteine des Zwei-Komponenten Systems, welches eine Rolle in der Virulenz spielt (Hentzer *et al.*, 2003).

Erste Hinweise auf der Transkriptionsebene über die Interaktion des synthetischen halogenierten Furanons C-30 mit den zellulären Signaltransduktionswegen und mit den Virulenzfaktoren von *M. haemolytica* und *P. multocida*, wurden in der vorliegenden Arbeit ausgearbeitet. Die Auswertung der Expressionsprofile deutete dabei auf einen Wirkmechanismus, der im Referenzkompendium nicht abgebildet war. Außerdem wurde keine eindeutig ausgeprägte Auswirkung von C-30 auf die Expression der Virulenzgene in beiden Bakterien festgestellt. C-30 beeinflusste die Transkription einer ähnlichen Anzahl von Virulenzgenen wie die Antibiotika des Referenzkompendiums. Dieses Ergebnis führte zur Ansicht, dass C-30 keine spezifische inhibierende Wirkung auf die Virulenzfaktoren von *M. haemolytica* und *P. multocida* ausübt, wie es der Fall in *P. aeruginosa* war (Hentzer *et al.*, 2003). Dementsprechend wurde diese Substanz nicht als ein Virulenzfaktor-Inhibitor angesehen. Die Verwendung von C-30 für die Arzneimittelentwicklung sollte als nächstes überprüft werden.

4.5 Ausblick

Das erstellte Referenzkompendium bietet eine wertvolle Grundlage für die zukünftige Identifizierung und Charakterisierung des Wirkmechanismus' neuer Wirksubstanzen gegen *M. haemolytica* und *P. multocida*. Zum einen können die Expressionsprofile für globale *cluster*-Analysen sowie für die Vergleiche der *fingerprints* eingesetzt werden. Zum anderen kann das etablierte *microarray* Auswertungsschema zur Analyse der Regulation charakteristischer Gene und spezifischer Stoffwechselwege genutzt werden.

In zukünftigen Arbeiten ist das Referenzkompendium mit den von zusätzlichen bekannten Antibiotika-induzierten Expressionsprofilen zu erweitern, um in Zukunft noch genauere Aussagen über die Wirkmechanismen neuer aktiver Substanzen zu ermöglichen. Außerdem ist das erstellte Referenzkompendium mit den Expressionsprofilen von *M. haemolytica* bzw. *P. multocida* Mutanten, z.B. mit durch eine Deletion „ausgeschalteten“ bekannten Zielproteinen von Antibiotika oder neuen möglichen Zielproteinen wie RecA oder LexA, zu ergänzen. Diese Expressionsprofile werden weiterführende Informationen über die Transkriptomveränderungen durch das „Ausschalten“ eines essentiellen Gens liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Erkenntnisse aus den Veränderungen der Expressionsprofile von *M. haemolytica* und *P. multocida* erworben, die für die künftige eingehende Aufklärung des Wirkmechanismus' der antibiotisch wirkenden Substanz Thiazin von Nutzen sind. Dabei sind die weiterführenden bioinformatischen Ansätze, wie die Annotation der regulierten hypothetischen Proteine, sowie die Aufstellung der Zusammenhänge zwischen den regulierten metabolischen Reaktionswegen, anzuwenden. Weiterhin ist zu ermitteln, ob die auffällige Induktion der Gene, die für die Proteine des Eisenaufnahmesystems kodieren, einen generellen Bestandteil des möglichen Wirkmechanismus von Thiazin darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine generelle Reprimierung der Expression der Virulenzgene bei *M. haemolytica* und *P. multocida* durch verschiedene Antibiotika festgestellt. In diesem Zusammenhang ist bei künftiger Forschungsarbeiten zu prüfen, ob diese Reprimierung der Virulenzgene eventuell eine Virulenzabschwächung bei beiden Erregern verursacht. Außerdem ist im Rahmen der Arzneistoffentwicklung zu ermitteln, ob die neuen aktiven Substanzen die Expression der Virulenzfaktoren beeinflussen, um dadurch wertvolle Hinweise auf ein mögliches Virulenzfaktor-Inhibitor zu erhalten.

In diesem Kontext haben die morphologischen Analysen der *P. multocida* Kapsel eine Verringerung der Kapsel durch die Inkubation mit einigen Antibiotika bei sub-MHK bestätigt. Die Kapsel ist essentiell für die Virulenz, was bereits durch publizierte Arbeiten von Chung *et al.* (2001) und Boyce & Adler (2006) gezeigt wurde. Die Rolle der einzelnen Kapselbiosynthese Proteine, wie beispielsweise PhyA bzw. PhyB bei *P. multocida* für die Morphologie und die Virulenz des Erregers ist noch zu erforschen. Zusätzlich ist die Identifizierung des Regulators (bzw. der Regulatoren) der Kapselgene eine interessante Aufgabe, um den Mechanismus der Kapselrepression durch Florfenicol und Trimethoprim aufzuklären. Diese hochinteressanten Forschungsarbeiten sollten im Rahmen eines neuen Projektes mit zusätzlicher Charakterisierung und der Phenotypisierung der *P. multocida phyA* bzw. *phyB knock-out* Mutanten durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

P. multocida und *M. haemolytica* sind gram negative Bakterien der Familie *Pasteurellaceae*, die eine weltweit verbreitete und ökonomisch wichtige Erkrankung bei Rindern, die Enzootische Bronchopneumonie, verursachen. Diese Erkrankung wird bevorzugt mit Antibiotika behandelt. Die stetig steigende Anzahl an resistenten Bakterien erfordert die Entwicklung neuer innovativer Antibiotika. Die Aufklärung des Wirkmechanismus' (MoA) neuer antibiotischer Substanzen ist dabei ein wesentlicher Schritt für die Optimierung geeigneter Kandidaten zum Wirkstoff. Die Analyse der Transkriptomveränderungen von *M. haemolytica* und *P. multocida* nach entsprechender Behandlung mittels *microarray* bietet eine exzellente Methode, erste Hinweise zum MoA unbekannter Substanzen zu bekommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Expressionsprofile von diesen beiden Erregern nach der Behandlung für 10 bzw. 30 min mit acht unterschiedlichen Antibiotika (Novobiocin, Enrofloxacin, Florfenicol, Tilmicosin, Cefquinom, Rifampicin, Trimethoprim und Brodimoprim), bildete ein bis dato einzigartiges Referenzkompendium zur Erforschung des MoAs einer antibiotischen Substanz mit unbekanntem MoA (Thiazin). Ferner bildete dieses Referenzkompendium eine Grundlage für die Charakterisierung der Expressionsprofile des halbsynthetischen Naturstoffes C-30 mit vermuteter Virulenzabschwächender Wirkung. Die für die *microarray* Auswertung eingesetzte optimierte Datenbearbeitung beinhaltete eine globale *cluster*-Analyse, eine *fingerprint*-Analyse, die Ermittlung der genomweiten Genregulation und der Regulation der Expression der Zielgene, sowie die Identifikation von Antibiotika spezifischen Signaturgenen. Zur Übersichtlichkeit der Auswertung und der Erörterung der Ergebnisse wurde ein Schwerpunkt auf die Expressionsprofile von *P. multocida* gelegt.

Mittels *cluster*-Analyse wurden die *P. multocida* Expressionsprofile in fünf *cluster* eingeteilt, wobei die Antibiotika mit ähnlichen MoA, mit Ausnahme von Enrofloxacin und Cefquinom, separate Gruppen bildeten. Die bakterizid wirkenden Antibiotika Enrofloxacin und Cefquinom verursachten einen geringen Effekt auf das Transkriptom von *P. multocida*, wobei nur etwa 1 % des Genoms beeinflusst wurde. Hingegen wurden 20 % des Genoms durch die bakteriostatisch wirkenden Antibiotika Florfenicol, Tilmicosin, Rifampicin, Trimethoprim und Brodimoprim reguliert. Novobiocin wirkte außergewöhnlich stark und regulierte 40 % des *P. multocida* Genoms. Eine Regulation der Ziel-

gene wurde bei Novobiocin (DNA Gyrase), Rifampicin (RNA Polymerase), Florfenicol (Ribosom) und Tilmicosin (Ribosom) festgestellt. Die Inhibitoren der Folatbiosynthese (Trimethoprim und Brodimoprim), der Inhibitor der DNA Gyrase (Enrofloxacin) und der Inhibitor der Zellwandbiosynthese (Cefquinom) verursachten dagegen keine Regulation der Zielgene. Die Signaturgene, die durch einzelne Antibiotika spezifisch reguliert worden waren, wurden für alle untersuchten Antibiotika identifiziert.

Die Aufnahme der Expressionsprofile zweier eng verwandter Bakterien zielte auf die einzigartige Möglichkeit, durch Vergleich der Regulation orthologer Gene, Hinweise auf den MoA einer neuen Substanz zu bekommen. Es zeigte sich allerdings, dass die Expressionsprofile in *M. haemolytica* und *P. multocida* sich erheblich unterschieden. Ein wichtiger Unterschied lag z.B. darin, dass bei *M. haemolytica* keine klare Trennung in der Anzahl der regulierten Gene zwischen den bakterizid und den bakteriostatisch wirkenden Antibiotika existierte.

Die Transkription vieler Virulenzgene, insbesondere solcher, die in Kapselbiosynthese und Kapseltransport, LPS Biosynthese, Kompetenz, Adhärenz und Eisenaufnahme involviert sind, wurde durch die Antibiotika beeinflusst. Dabei wurde die Expression generell reprimiert. Ein weitgehend induzierender Effekt wurde bei Rifampicin, z.B. die Induktion der in der Adhärenz involvierten *tad* Gene, gefunden. Novobiocin und Trimethoprim verursachten eine deutliche Reprimierung der Kapselgene von *P. multocida*, was in der Tat zu einer schlechten Ausbildung der Kapsel führte. Für Florfenicol konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen Kapselgenregulation und Verringerung der Kapsel gezeigt werden.

Mit Hilfe des Referenzkompendiums wurden die Thiazin-induzierten Expressionsprofile von *M. haemolytica* und *P. multocida* untersucht. Thiazin ist eine antibiotisch hochwirksame Substanz für *Pasteurellaceae*, deren Wirkmechanismus noch nicht bekannt ist. Die Thiazin-induzierten Expressionsprofile in *M. haemolytica* und *P. multocida* führten nicht zu konkreten Hinweisen auf das Zielprotein oder die Zielproteine. Allerdings lässt die Tatsache, dass die Thiazin-induzierten Expressionsprofile keine Ähnlichkeiten zu den Expressionsprofilen des Referenzkompendiums zeigten, auf einen neuen Wirkmechanismus schließen. In *M. haemolytica* wurden mehrere Eisentransporter durch Thiazin induziert, wie z.B. *yfeABCD*, *tonB* und *exbBD*. Allerdings konnte kein direkter Einfluss des Thiazins auf die entsprechenden Gene gemessen werden.

Zu den möglichen Kandidaten für das Zielprotein oder die Zielproteine von Thiazin wurden die 18 orthologe Gene, die in beiden Bakterien induziert wurden, gezählt.

Die Wirkung von C-30, einem halogenierten Furanon, wurde ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, dass C-30 die Transkription einer ähnlichen Anzahl von Virulenzgenen beeinflusste, wie die Substanzen des Referenzkompendiums. Von 165 potentiellen *P. multocida* Virulenzgenen wurden 23 durch C-30 (10 μ M) reguliert. Darunter waren Gene, die für die Protease ClpB und die Katalase HtkE kodieren, sowie zwei weitere Gene aus dem Eisentransportsystem (*exbB* und *exbD*). Durch die Inkubation mit der höheren Konzentration von C-30 (50 μ M) wurden sogar noch mehr Virulenzgene (insgesamt 99 in *P. multocida*) beeinflusst, und zwar hauptsächlich reprimiert. Dazu zählten die acht Gene für Kapselbiosynthese und –transport, sowie die Kompetenzgene *comABCDE*, *comM* und *comF*. Dieses Ergebnis zeigte eindeutig eine konzentrationsabhängige Wirkung von C-30 auf die Transkription von Virulenzgenen bei *P. multocida*, die jedoch nicht ausschließlich inhibierend war.

Das Referenzkompendium in *M. haemolytica* und *P. multocida* bildete eine solide Grundlage für eine erste Charakterisierung des MoAs einer neuen antibiotisch wirksamen Substanz und eines potentiellen Virulenzinhibitors. Es zeigte sich allerdings, dass zum Teil große Unterschiede in der transkriptionellen Antwort beider Bakterien auf Antibiotika-Behandlung existieren, die zur Vorsicht bei einer vergleichenden MoA Analyse mahnen. Es zeigte sich weiterhin, dass bei neuen MoAs, wie z.B. beim Thiazin, die globale Transkriptom-Analyse nur einen ersten Schritt darstellt, der durch biochemische und molekularbiologische Studien begleitet werden muss. Der festgestellte bevorzugt negative Effekt auf die Transkription der Virulenzgene durch Antibiotika-Behandlung lässt vermuten, dass der therapeutische Effekt auf einer Kombination von Wachstumshemmung und Virulenzabschwächung beruht. Letzteres könnte auch bei den im Gewebe verbreiteten Wirkstoffkonzentrationen unterhalb der Wachstumshemmung stattfinden und somit als eine mögliche Erklärung für die beobachteten klinischen Effekte bei sub-MHK herangezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Al Ghamdi, G.M., T.R.Ames, J.C.Baker, R.Walker, C.C.Chase, G.H.Frank, S.K.Maheswaran. 2000. "Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States." *J Vet Diagn. Invest.* 12:576-578.
- Alksne LE, Dunman PM. 2008. "Target-based antimicrobial drug discovery." *Methods Mol Biol.* 431:271-83.
- Allan, E.M., A.Wiseman, H.A.Gibbs, I.E.Selman. 1985. "*Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns." *Vet Rec.* 117:629-631.
- Allen, J.W., L.Viel, K.G.Bateman, S.Rosendal, P.E.Shewen, P.Physick-Sheard. 1991. "The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures." *Can J Vet Res.* 55:341-346.
- Ames, T.R. 1997. "Dairy calf pneumonia. The disease and its impact." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13:379-391.
- Amyes, S.G. 1993. "Comparative antibacterial spectrum of trimethoprim and brodimoprim." *J Chemother.* 5:417-421.
- Angen, O., M.Quirie, W.Donachie, M.Bisgaard. 1999. "Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping." *Vet Microbiol.* 65:283-290.
- Anon. 2000. "TU Spezial – Impfstoffe & Sera für Tiere." *Verleger-Beilage zur Tierärztl.Umsch.* 8:1-32.
- Apley M. 2007. Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, Band 22 (2006) Heft 2, S.399-411.
- Apley, M. 1997. "Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13:549-574.
- Apley, M.D., S.A.Brown, P.J.Fedorka-Cray, S.Ferenc, J.K.House, J.E.Riviere, L.B.Rice, C.Thornsberry, J.Waddell. 1998. "Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public health perspectives." *J Am Vet Med Assoc.* 212:1209-1213.
- Bader, M.W., W.W.Navarre, W.Shiau, H.Nikaido, J.G.Frye, M.McClelland, F.C.Fang, S.I.Miller. 2003. "Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides." *Mol Microbiol.* 50:219-230.
- Baggot, J.D., R.D.Walker, J.F.Prescott, P.M.Dowling, S.Giquere. 2007. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Wiley, John & Sons, Incorporated.
- Beer, J. 1980. "Infektionskrankheiten der Respirationsorgane des Kalbes und Jung-rindes." In J.Beer, editor, *Infektionskrankheiten der Haustiere.* VEB Gustav Fischer Verlag. Jena. 115-118.
- Berchtold, M., W.Zaremba, E.Grunert. 1990. "Kälberkrankheiten." In K.Walser u.H.Bostedt, editor, *Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere.* Enke Verlag. Stuttgart. 235-260.
- Berger, J.M. & J.C.Wang. 1996. "Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism." *Curr Opin Struct.Biol.* 6:84-90.
- Berggren, K.A., C.S.Baluyut, R.R.Simonson, W.J.Bemrick, S.K.Maheswaran. 1981. "Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils." *Am J Vet Res.* 42:1383-1388.

- Berry, B.A., C.R. Krehbiel, A.W. Confer, D.R. Gill, R.A. Smith, M. Montelongo. 2004. "Effects of dietary energy and starch concentrations for newly received feedlot calves: I. Growth performance and health." *J Anim Sci.* 82:837-844.
- Biberstein, E.L. 1990. "*Pasteurella*." In E.L. Biberstein and Y.C. Zee, editors, *Review of Veterinary Microbiology*. Blackwell Scientific Publications. Boston, Oxford. 175-180.
- Booker, C.W., G.K. Jim, P.T. Guichon, O.C. Schunicht, B.E. Thorlakson, P.W. Lockwood. 1997. "Evaluation of florfenicol for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada." *Can Vet J.* 38:555-560.
- Bosch, M., M.E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Perez De Rozas, I. Badiola, J. Barbe. 2002a. "Characterization of the *Pasteurella multocida* *hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein." *Infect Immun.* 70:5955-5964.
- Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Perez De Rozas, I. Badiola, J. Barbe. 2002b. "*Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed." *FEMS Microbiol Lett.* 210:201-208.
- Boshoff, H.I., T.G. Myers, B.R. Copp, M.R. McNeil, M.A. Wilson, C.E. Barry, III. 2004. "The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action." *J Biol Chem.* 279:40174-40184.
- Botcher, L., I. Stoter, E. Hellmann. 1993. "[In vitro adherence of *Pasteurella haemolytica* to tracheal mucins and a tracheal epithelial cell preparation from cattle]." *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 106:333-336.
- Boyce, J.D., J.Y. Chung, B. Adler. 2000b. "Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2)." *Vet Microbiol.* 72:121-134.
- Boyce, J.D. & B. Adler. 2000. "The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2)." *Infect Immun.* 68:3463-3468.
- Boyce, J.D., J.Y. Chung, B. Adler. 2000a. "*Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics." *J Biotechnol.* 83:153-160.
- Boyce, J.D. & B. Adler. 2006. "How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment?" *Curr Opin Microbiol.* 9:117-122.
- Braun, V., 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol* 16, 295-307.
- Braunsteiner, A.R. & F. Finsinger. 1993. "Brodinoprim: therapeutic efficacy and safety in the treatment of bacterial infections." *J Chemother.* 5:507-511.
- Brazas, M.D. & R.E. Hancock. 2005. "Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance." *Drug Discov Today.* 10:1245-1252.
- Bush, K. & S. Mobashery. 1998. "How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention." *Adv. Exp Med Biol.* 456:71-98.
- Carter, G.R. 1955. "Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types." *Am J Vet Res.* 16:481-484.
- Catry, B., F. Haesebrouck, S.D. Vlieghe, B. Feyen, M. Vanrobaeys, G. Opsomer, S. Schwarz, A.D. Kruif. 2005. "Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types." *Microb. Drug Resist.* 11:387-394.
- Chae, C.H., M.J. Gentry, A.W. Confer, G.A. Anderson. 1990. "Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1." *Vet Microbiol.* 25:241-251.

- Chan, Y.Y., Y.M.Ong, K.L.Chua. 2007. "Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*." *Antimicrob Agents Chemother.* 51:623-630.
- Chin, N.X., J.W.Gu, W.Fang, H.C.Neu. 1992. "In vitro activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin antibiotics." *Diagn.Microbiol Infect Dis.* 15:331-337.
- Chung, J.Y., Y.Zhang, B.Adler. 1998. "The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1." *FEMS Microbiol Lett.* 166:289-296.
- Chung, J.Y., I.Wilkie, J.D.Boyce, K.M.Townsend, A.J.Frost, M.Ghoddusi, B.Adler. 2001. "Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A." *Infect Immun.* 69:2487-2492.
- Cirz, R.T., J.K.Chin, D.R.Andes, V.Crecy-Lagard, W.A.Craig, F.E.Romesberg. 2005. "Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance." *PLoS Biol.* 3:e176.
- Collier, J.R. 1968. "Significance of bacteria in bovine respiratory disease." *J Am Vet Med Assoc.* 153:1645-1651.
- Confer, A.W., R.J.Pancier, D.A.Mosier. 1988. "Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*." *J Am Vet Med Assoc.* 193:1308-1316.
- Confer, A.W., R.J.Pancier, K.D.Clinkenbeard, D.A.Mosier. 1990b. "Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*." *Can J Vet Res.* 54 Suppl: S48-S52.
- Confer, A.W., K.R.Simons, M.T.Barrie, K.D.Clinkenbeard. 1990a. "Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on neutrophils from white-tailed deer and several exotic ruminant species." *Vet Res Commun.* 14:175-180.
- Confer, A.W. 1993. "Immunogens of *Pasteurella*." *Vet Microbiol.* 37:353-368.
- Confer, A.W., S.H.Nutt, S.M.Dabo, R.J.Pancier, G.L.Murphy. 1996. "Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3." *Am J Vet Res.* 57:1453-1457.
- Corbeil, L.B. & R.P.Gogolewski. 1985. "Mechanisms of bacterial injury." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1:367-376.
- Cox, A.J., M.L.Hunt, J.D.Boyce, B.Adler. 2003. "Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*." *Microb.Pathog.* 34:287-296.
- Cusack, P.M., N.McMeniman, I.J.Lean. 2003. "The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots." *Aust Vet J.* 81:480-487.
- Dabo, S.M., J.D.Taylor, A.W.Confer. 2007. "*Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease." *Anim Health Res Rev.* 8:129-150.
- Darnell K.R., M.E.Hart, F.R.Champlin. 1986. Variability of cell surface hydrophobicity among *Pasteurella multocida* somatic serotype and *Actinobacillus lignieresii* strains. *J Clin Microbiol.* Jan;25(1):67-71.
- Diarra, M.S., F.Malouin, M.Jacques. 1999. "Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, apramycin at subminimal and suprainhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens." *Int J Antimicrob Agents.* 12:229-237.
- Dirksen, G. 1987. "[Herd therapy and prevention in cattle]." *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* 100:294-296.
- Dirksen, G. 1989. "[Infection-limited disease factors in cattle]." *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* 102:414-417.
- Domingue, G.J., Sr. & H.B.Woody. 1997. "Bacterial persistence and expression of disease." *Clin Microbiol Rev.* 10:320-344.

- Donnio, P.Y., C. Le Goff, J.L. Avril, P. Pouedras, S. Gras-Rouzet. 1994. "*Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders." *Vet Res.* 25:8-15.
- Drlica, K. & X. Zhao. 1997. "DNA gyrase, topoisomerase IV, the 4-quinolones." *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:377-392.
- Duff, G.C. & M.L. Galyean. 2007. "Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle." *J Anim Sci.* 85:823-840.
- Ewers, C., A. Lubke-Becker, L.H. Wieler. 2004b. "[*Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterial type]." *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117:367-386.
- Ewers, C., A. Lubke-Becker, L.H. Wieler. 2004a. "[*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia]." *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117:97-115.
- Fernández de Henestrosa, A.R., Badiola, I., Saco, M., Perez de Rozas, A.M., Campoy, S., Barbé, J. 1997. Importance of the galE gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett.* 154, 311-6.
- Finlay, B.B. & S. Falkow. 1997. "Common themes in microbial pathogenicity revisited." *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:136-169.
- Fischer, H.P. & C. Freiberg. 2007. "Applications of transcriptional profiling in antibiotics discovery and development." *Prog. Drug Res.* 64:21, 23-21, 47.
- Floss, H.G. & T.W. Yu. 2005. "Rifamycin-mode of action, resistance, biosynthesis." *Chem Rev.* 105:621-632.
- Foged, N.T. 1992. "*Pasteurella multocida* toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs." *APMIS Suppl.* 25:1-56.
- Frank, G.H., S.L. Nelson, R.E. Briggs. 1989. "Infection of the middle nasal meatus of calves with *Pasteurella haemolytica* serotype 1." *Am J Vet Res.* 50:1297-1301.
- Frank, G.H., R.E. Briggs, R.W. Loan, C.W. Purdy, E.S. Zehr. 1996. "Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle." *Am J Vet Res.* 57:1317-1320.
- Frank, G.H., R.E. Briggs, G.C. Duff, R.W. Loan, C.W. Purdy. 2002. "Effects of vaccination prior to transit and administration of florfenicol at time of arrival in a feedlot on the health of transported calves and detection of *Mannheimia haemolytica* in nasal secretions." *Am J Vet Res.* 63:251-256.
- Freiberg, C., H. Brotz-Oesterhelt, H. Labischinski. 2004. "The impact of transcriptome and proteome analyses on antibiotic drug discovery." *Curr Opin Microbiol.* 7:451-459.
- Freiberg, C., H.P. Fischer, N.A. Brunner. 2005. "Discovering the mechanism of action of novel antibacterial agents through transcriptional profiling of conditional mutants." *Antimicrob Agents Chemother.* 49:749-759.
- Freiberg, C., N. Brunner, L. Macko, H.P. Fischer. 2006. "Discovering antibiotic efficacy biomarkers: toward mechanism-specific high content compound screening." *Mol Cell Proteomics.* 5:2326-2335.
- Furesz, S. 1970. "Chemical and biological properties of rifampicin." *Antibiot Chemother.* 16:316-351.
- Galperin, M.Y. & E.V. Koonin. 1999. "Searching for drug targets in microbial genomes." *Curr Opin Biotechnol.* 10:571-578.

- Gioia, J., X. Qin, H. Jiang, K. Clinkenbeard, R. Lo, Y. Liu, G. E. Fox, S. Yerrapragada, M. P. McLeod, T. Z. McNeill, L. Hemphill, E. Sodergren, Q. Wang, D. M. Muzny, F. J. Homsy, G. M. Weinstock, S. K. Highlander. 2006. "The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, *Pasteurellaceae* phylogeny." *J Bacteriol.* 188:7257-7266.
- Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck, S. Evers. 2001. "Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis." *Genome Res.* 11:28-42.
- Graham, M. R. & R. Y. Lo. 1997. "Cloning and characterization of the *exbB-exbD-tonB* locus of *Pasteurella haemolytica* A1." *Gene.* 186:201-205.
- Graham, M. R. & R. Y. Lo. 2002. "A putative iron-regulated TonB-dependent receptor of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1: possible mechanism for phase variation." *Vet Microbiol.* 84:53-67.
- Gräfe, U. 1992. *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin-New York.
- Griffin, D. 1997. "Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13:367-377.
- Gründer, H.-D. 1988. "Neuere Behandlungsmöglichkeiten bei der enzootischen Bronchopneumonie des Rindes." *Prakt. Tierarzt.* 69:60-68.
- Han, J. H., C. Stratowa, W. J. Rutter. 1987. Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry* 26, 1617-1625.
- Harper, M., J. D. Boyce, B. Adler. 2006. "*Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur." *FEMS Microbiol Lett.* 265:1-10.
- Heddleston, K., L. P. Watco, P. A. Rebers. 1964. "Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*." *Avian Dis.* 8:649-657.
- Hentzer, M., H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J. W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, M. Givskov. 2003. "Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors." *EMBO J.* 22:3803-3815.
- Highlander, S. K. 2001. "Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*." *Front Biosci.* 6:D1128-D1150.
- Hoar, B. R., M. D. Jelinski, C. S. Ribble, E. D. Janzen, J. C. Johnson. 1998. "A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada." *Can Vet J.* 39:161-166.
- Hofmann, W. 1992. "Rinderkrankheiten." Bd. 1. Innere und chirurgische Erkrankungen. Ulmer Verlag. Stuttgart. 126-129.
- Hoffman, J. A., J. L. Badger, Y. Zhang, S. H. Huang, K. S. Kim. 2000. *Escherichia coli* K1 *aslA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo *Infect Immun.* 68 :5062-7.
- Hornish, R. E. & S. F. Kotarski. 2002. "Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals." *Curr Top Med Chem.* 2:717-731.
- Houghton, S. B. & R. N. Gourlay. 1984. "Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves." *Res Vet Sci.* 37:194-198.
- Hörmansdorfer, S. & J. Bauer. 1996. "Zur Resistenzsituation boviner Pasteurellen." *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 109:168-171.

- Hu, S.P., L.J. Felice, V. Sivanandan, S.K. Maheswaran. 1986. "Siderophore production by *Pasteurella multocida*." *Infect Immun.* 54:804-810.
- Hughes, T.R., C.J. Roberts, H. Dai, A.R. Jones, M.R. Meyer, D. Slade, J. Burchard, S. Dow, T.R. Ward, M.J. Kidd, S.H. Friend, M.J. Marton. 2000. "Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling." *Nat Genet.* 25:333-337.
- Hutter, B., C. Schaab, S. Albrecht, M. Borgmann, N.A. Brunner, C. Freiberg, K. Ziegelbauer, C.O. Rock, I. Ivanov, H. Loferer. 2004. "Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling." *Antimicrob Agents Chemother.* 48:2838-2844.
- Jacques, M. & B. Foiry. 1987. Electron microscopic visualization of capsular material of *Pasteurella multocida* types A and D labeled with polycationic ferritin. *J Bacteriol.* 169(8):3470-2.
- Jacques, M., M. Kobisch, M. Belanger, F. Dugal. 1993. "Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus." *Infect Immun.* 61:4785-4792.
- Jaramillo, L., F. Diaz, P. Hernandez, H. Debray, F. Trigo, G. Mendoza, E. Zenteno. 2000. "Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*." *Glycobiology.* 10:31-37.
- Jericho, K.W., S.E. Magwood, P.H. Stockdale. 1976. "Letter to the editor: Prevention of experimental bovine pneumonic pasteurellosis by exposure to IBR virus." *Can Vet J.* 17:194-195.
- Jericho, K.W. & E.V. Langford. 1978. "Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*." *Can J Comp Med.* 42:269-277.
- Jeyaseelan, S., S. Sreevatsan, S.K. Maheswaran. 2002. "Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis." *Anim Health Res Rev.* 3:69-82.
- Johnson, E.G. 1985. "Feedlot management practices and bovine respiratory disease." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1:413-418.
- Kaldalu, N., R. Mei, K. Lewis. 2004. "Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile." *Antimicrob Agents Chemother.* 48:890-896.
- Kehrenberg, C., G. Schulze-Tanzil, J.L. Martel, E. Chaslus-Dancla, S. Schwarz. 2001. "Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis." *Vet Res.* 32:323-339.
- Kielstein, P., D. Schimmel, F. Horch. 1981. "Vergleichende ätiopathogenetische Untersuchungen zur Pneumonie des Kalbes und Schweines." *Monatsh. Veterinärmed.* 36:133-139.
- Kielstein, P. & D. Schimmel. 1983. "Durch Pasteurellen bedingte Pneumonien des Kalbes und Möglichkeiten ihrer experimentellen Übertragung." *Monatsh. Veterinärmed.* 38:83-87.
- Kirby, S.D., F.A. Lainson, W. Donachie, A. Okabe, M. Tokuda, O. Hatase, A.B. Schryvers. 1998. "The *Pasteurella haemolytica* 35 kDa iron-regulated protein is an FbpA homologue." *Microbiology.* 144 (Pt 12):3425-3436.
- Kirkpatrick, J.G., D.L. Step, M.E. Payton, J.B. Richards, L.F. McTague, J.T. Saliki, A.W. Confer, B.J. Cook, S.H. Ingram, J.C. Wright. 2008. "Effect of age at the time of vaccination on antibody titers and feedlot performance in beef calves." *J Am Vet Med Assoc.* 233:136-142.

- Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, B. Hayete, C.A. Lawrence, J.J. Collins. 2007. "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell*. 130:797-810.
- Kristiansen, J.E. & L. Amaral. 1997. "The potential management of resistant infections with non-antibiotics." *J Antimicrob Chemother*. 40:319-327.
- Kroll, J.S., P.R. Langford, B.M. Loynds. 1991. "Copper-zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*." *J Bacteriol*. 173:7449-7457.
- Kroll, J.S., P.R. Langford, K.E. Wilks, A.D. Keil. 1995. "Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, not so rare after all!" *Microbiology*. 141 (Pt 9):2271-2279.
- Lainson, F.A., N. Thomson, H.A. Rowe, P.R. Langford, K.D. Aitchison, W. Donachie, J.S. Kroll. 1996. "Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution." *FEMS Microbiol Lett*. 142:11-17.
- Lewin, C.S. & S.G. Amyes. 1991. "The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim." *J Med Microbiol*. 34:329-332.
- Lewis, P.R. & D.P. Knight. 1977. Practical methods in electron microscopy: staining methods for sectioned material. (Glauert A.M., ed). Elsevier, North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam.
- Lewis, R.J., F.T. Tsai, D.B. Wigley. 1996. "Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase." *Bioessays*. 18:661-671.
- Limbert, M., D. Isert, N. Klesel, A. Markus, K. Seeger, G. Seibert, E. Schrunner. 1991. "Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin." *Antimicrob Agents Chemother*. 35:14-19.
- Lin, J.T., M.B. Connelly, C. Amolo, S. Otani, D.S. Yaver. 2005. "Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis." *Antimicrob Agents Chemother*. 49:1915-1926.
- Linares, J.F., I. Gustafsson, F. Baquero, J.L. Martinez. 2006. "Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:19484-19489.
- Lo, R.Y., C.A. Strathdee, P.E. Shewen, B.J. Cooney. 1991. "Molecular studies of Ssa1, a serotype-specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1." *Infect Immun*. 59:3398-3406.
- Lo, R.Y., L.J. McKerral, T.L. Hills, M. Kostrzynska. 2001. "Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system." *Infect Immun*. 69:4458-4464.
- Lo, R.Y. 2001. "Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1." *Vet Microbiol*. 83:23-35.
- Lockhart, D.J. & E.A. Winzeler. 2000. "Genomics, gene expression and DNA arrays." *Nature*. 405:827-836.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol.*; 9:409-14.
- Mahasreshiti, P.J., G.L. Murphy, J.H. Wyckoff, III, S. Farmer, R.E. Hancock, A.W. Confer. 1997. "Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*." *Infect Immun*. 65:211-218.
- Mandell, G.L. 1983. "The antimicrobial activity of rifampin: emphasis on the relation to phagocytes." *Rev Infect Dis*. 5 Suppl 3:S463-S467.

- Marra,A. 2004. "Can virulence factors be viable antibacterial targets?" *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2:61-72.
- Marschang,F. 1998. *Pasteurellen-Erkrankungen im modernen Rinderbetrieb.* H.Hoffmann GmbH Verlag. Berlin.
- Martin,S.W., A.H.Meek, D.G.Davis, J.A.Johnson, R.A.Curtis. 1982. "Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: the Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980." *Can J Comp Med.* 46:341-349.
- May,B.J., Q.Zhang, L.L.Li, M.L.Paustian, T.S.Whittam, V.Kapur. 2001. "Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3460-3465.
- Mayr A. 1990. "Belebte Krankheitsursachen." In W.E.Stünzi H, editor, Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Verlag Paul Parey Berlin u. Hamburg. 48-63.
- Mayr,A. 1980. "Neue Impfstoffe und Immunisierungsmethoden bei Kalb und Rind." *Prakt.Tierarzt.* 61:13-16.
- Mayr,A. 1986. "[Pathogenesis and control of infectious diseases caused by factors in animal production]." *Zentralbl Veterinarmed B.* 33:637-649.
- McKerral,L.J. & R.Y.Lo. 2002. "Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1." *Infect Immun.* 70:2622-2629.
- Melnikow E., C.Schoenfeld, V.Spehr, R.Warrass, N.Gunkel, M.Duszenko, P.M.Selzer, H.J.Ullrich. 2008. A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. *Vet Microbiol.* 131(3-4):277-92.
- Mengozi,G., L.Intorre, S.Bertini, G.Soldani. 1996. "Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep." *Am J Vet Res.* 57:1040-1043.
- Mevius D.J. & E.G.Hartman 2000. [In vitro activity of 12 antibiotics used in veterinary medicine against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves in the Netherlands] *Tijdschr Diergeneeskd.* Mar 1;125(5):147-52.
- Mosier,D.A., A.W.Confer, R.J.Panciera. 1989. "The evolution of vaccines for bovine pneumonic pasteurellosis." *Res Vet Sci.* 47:1-10.
- Mosier,D.A., K.R.Simons, J.G.Vestweber. 1995. "Passive protection of calves with *Pasteurella haemolytica* antiserum." *Am J Vet Res.* 56:1317-1321.
- Mosier,D.A. 1997. "Bacterial pneumonia." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13:483-493.
- Mosier,D.A., R.J.Panciera, D.P.Rogers, G.A.Uhlich, M.D.Butine, A.W.Confer, R.J.Basaraba. 1998. "Comparison of serologic and protective responses induced by two *Pasteurella* vaccines." *Can J Vet Res.* 62:178-182.
- Murphy,S.P., M.E.Erwin, R.N.Jones. 1994. "Cefquinome (HR 111V). In vitro evaluation of a broad-spectrum cephalosporin indicated for infections in animals." *Diagn.Microbiol Infect Dis.* 20:49-55.
- Musser,J., G.D.Mechor, Y.T.Grohn, E.J.Dubovi, S.Shin. 1996. "Comparison of tilimicosin with long-acting oxytetracycline for treatment of respiratory tract disease in calves." *J Am Vet Med Assoc.* 208:102-106.
- Nalca,Y., L.Jansch, F.Bredenbruch, R.Geffers, J.Buer, S.Haussler. 2006. "Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach." *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1680-1688.
- Nanduri,B., M.L.Lawrence, C.R.Boyle, M.Ramkumar, S.C.Burgess. 2006. "Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on the *Pasteurella multocida* proteome." *J Proteome.Res.* 5:572-580.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Document M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Ng,W.L., K.M.Kazmierczak, G.T.Robertson, R.Gilmour, M.E.Winkler. 2003. "Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors." *J Bacteriol.* 185:359-370.
- Ogunnariwo,J.A. & A.B.Schryvers. 2001. "Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*." *J Bacteriol.* 183:890-896.
- Oros,J., A.Fernandez, J.L.Rodriguez, F.Rodriguez, J.B.Poveda. 1997. "Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats." *Zentralbl Veterinarmed B.* 44:99-104.
- Ose,E.E. & L.V.Tonkinson. 1988. "Single-dose treatment of neonatal calf pneumonia with the new macrolide antibiotic tilmicosin." *Vet Rec.* 123:367-369.
- Panciera,R.J. & R.E.Corstvet. 1984. "Bovine pneumonic pasteurellosis: model for *Pasteurella haemolytica*- and *Pasteurella multocida*-induced pneumonia in cattle." *Am J Vet Res.* 45:2532-2537.
- Paulsen,D.B., D.A.Mosier, K.D.Clinkenbeard, A.W.Confer. 1989. "Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on bovine pulmonary endothelial cells in vitro." *Am J Vet Res.* 50:1633-1637.
- Potter,A.A., K.Ready, J.Gilchrist. 1988. "Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1." *Microb.Pathog.* 4:311-316.
- Prescott,J.F., R.D.Walker, J.D.Baggot. 1998. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Wiley, John & Sons, Incorporated.
- Prescott, J. F., J.D.Baggot, R.D.Walker. 2000. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3d ed., Iowa State University Press, Ames.
- Priebe S. & S.Schwarz. 2003. In vitro activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;47(8):2703-5.
- Proctor,R.A., P.Wick, R.J.Hamill, P.Horstmeier, J.Gullings-Handley, M.Weisensel, G.Brandt. 1987. "In-vitro studies of antibiotic combinations for multiply-resistant coagulase-negative staphylococci." *J Antimicrob Chemother.* 20:223-231.
- Purdy,C.W., R.H.Raleigh, J.K.Collins, J.L.Watts, D.C.Straus. 1997. "Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves." *Curr Microbiol.* 34:244-249.
- Quinlivan,E.P., J.McPartlin, D.G.Weir, J.Scott. 2000. "Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited." *FASEB J.* 14:2519-2524.
- Quirie,M., W.Donachie, N.J.Gilmour. 1986. "Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle." *Vet Rec.* 119:93-94.
- Radostits,O.M. & I.R.Littlejohns. 1988. "New Concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus." *Can Vet J.* 29:513-528.
- Radostits,O.M., C.C.Gay, D.C.Blood, K.W.Hinchcliff. 2000. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses. Saunders, Philadelphia. London.
- Radostits,O.M. 2004. "Fluoroquinolone resistance trends and animal drug use: a retrospective analysis." *Int J Infect Dis.* 8:187-189.

- Ratledge, C. & L.G. Dover. 2000. "Iron metabolism in pathogenic bacteria." *Annu. Rev Microbiol.* 54:881-941.
- Reece, R.J. & A. Maxwell. 1991. "DNA gyrase: structure and function." *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 26:335-375.
- Ren, D., J.J. Sims, T.K. Wood. 2001. "Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone." *Environ Microbiol.* 3:731-736.
- Ren, D., L.A. Bedzyk, P. Setlow, D.F. England, S. Kjelleberg, S.M. Thomas, R.W. Ye, T.K. Wood. 2004b. "Differential gene expression to investigate the effect of (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone on *Bacillus subtilis*." *Appl Environ Microbiol.* 70:4941-4949.
- Ren, D., L.A. Bedzyk, R.W. Ye, S.M. Thomas, T.K. Wood. 2004a. "Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*." *Biotechnol. Bioeng.* 88:630-642.
- Ribble, C.S., A.H. Meek, P.E. Shewen, G.K. Jim, P.T. Guichon. 1995. "Effect of transportation on fatal fibrinous pneumonia and shrinkage in calves arriving at a large feedlot." *J Am Vet Med Assoc.* 207:612-615.
- Ribble, C.S., A.H. Meek, E.D. Janzen, P.T. Guichon, G.K. Jim. 1995. "Effect of time of year, weather, the pattern of auction market sales on fatal fibrinous pneumonia (shipping fever) in calves in a large feedlot in Alberta (1985-1988)." *Can J Vet Res.* 59:167-172.
- Rice, J.A., L. Carrasco-Medina, D.C. Hodgins, P.E. Shewen. 2007. "*Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease." *Anim Health Res Rev.* 8:117-128.
- Rietschel, E.T., L. Brade, F.U. Schade, U. Seydel, U. Zahringer, U. Mamat, G. Schmidt, A.J. Ulmer, H. Loppnow, H.D. Flad, . 1993. "[Bacterial endotoxins: relationship between chemical structure and biological effect]." *Immun Infekt.* 21:26-35.
- Rimler, R.B. & K.R. Rhoades. 1989. "Solubilization of membrane-associated cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*." *Avian Dis.* 33:258-263.
- Robb, E.J., C.M. Tucker, L. Corley, W.L. Bryson, K.C. Rogers, K. Sturgess, D.J. Bade, B. Brodersen. 2007. "Efficacy of tulathromycin or enrofloxacin for initial treatment of naturally occurring bovine respiratory disease in feeder calves." *Vet Ther.* 8:127-135.
- Roberts, I.S. 1996. "The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria." *Annu. Rev Microbiol.* 50:285-315.
- Roca, J. 1995. "The mechanisms of DNA topoisomerases." *Trends Biochem Sci.* 20:156-160.
- Roehrig, S.C., H.Q. Tran, V. Spehr, N. Gunkel, P.M. Selzer, H.J. Ullrich. 2007. "The response of *Mannheimia haemolytica* to iron limitation: implications for the acquisition of iron in the bovine lung." *Vet Microbiol.* 121:316-329.
- Rolle, M. & A. Mayr. 1993. *Medizinische Mikrobiologie, Infektionslehre und Seuchenlehre.* Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart.
- Rolle, M. & A. Mayr. 2002. "Bakterielle Krankheiten der Tiere." In H.-J. Selbitz, editor, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Enke Verlag. Stuttgart. 492-499.
- Rowe, H.A., D.P. Knox, I.R. Poxton, W. Donachie. 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.

- Saban,R., R.V.Broadstone, M.Haak-Frendscho, S.Skoyen, J.Fialkowski, S.K.Maheswaran, D.E.Bjorling, C.Czuprynski. 1997. "Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and lipopolysaccharide on histamine, prostanoid, leukotriene release by bovine lung parenchyma in vitro." *Am J Vet Res.* 58:1227-1231.
- Sanger,F., S.Nicklen, A.R.Coulson. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* 74, 5463-5467.
- Sambrook, J. & D.W.Russel. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York.
- Schena, M. 2000. *Microarray Biochip Technology*. Eaton Publishing Company/Biotechniques Books.
- Schimmel,D. & P.Kielstein. 1980. "Bedeutung bakterieller Infektionen im enzootischen Pneumoniekomplex der Kälber und Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung." *Mh. Vet.Med.* 35:30-31.
- Schimmel,D. 1987. "[Results of experimental infection of calves with *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*]." *Arch Exp Veterinarmed.* 41:463-472.
- Schimmel,D., W.Erler, R.Putsche, B.Jacob. 1992. "[The importance of dermonecrotin and dermonecrotinoid of *Pasteurella multocida* for the calf]." *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* 105:233-235.
- Schimmel,D., W.Erler, I.Hanel, I, W.Muller. 1994. "[Detection of *Pasteurella multocida* toxin - a comparison of in vitro and in vivo methods]." *ALTEX.* 11:59-61.
- Scholz,H., G.Amtsberg, U.Westermilies, A.Binder, H.Kirchhoff. 1987. "Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes. 1. Versuchsanstellung und mikrobieller Status von Nasen- und Tracheobronchialsekret." *Tierärztl.Umschau.* 42:272-280.
- Schulz,G., H.Blohm, K.D.Umlauf, B.Hajesch. 1990. "[The colonization of the upper respiratory tract and the bacteremic phases of enzootic pneumonia of calves]." *Arch Exp Veterinarmed.* 44:475-480.
- Schwarz,S. & C.Kehrenberg. 2006. "Old dogs that learn new tricks: modified antimicrobial agents that escape pre-existing resistance mechanisms." *Int J Med Microbiol.* 296 Suppl 41:45-49.
- Selbitz,H.-J. 1992. *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. Fischer Verlag. Jena, Stuttgart.
- Selzer,P.M., S.Brutsche, P.Wiesner, P.Schmid, H.Mullner. 2000. "Target-based drug discovery for the development of novel antiinfectives." *Int.J Med Microbiol.* 290:191-201.
- Selzer,P.M., R.J.Marhöfer, A.Rohwer. 2004. *Angewandte Bioinformatik - Eine Einführung*. Springer-Verlag. Heidelberg, Berlin, New York.
- Shah,N.H., J.Biewenga, N.H.Shah, F.K.de Graaf. 1996. "Vacuolating cytotoxic activity of *Pasteurella multocida* causing haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle." *FEMS Microbiol Lett.* 143:97-101.
- Shaw,K.J., N.Miller, X.Liu, D.Lerner, J.Wan, A.Bittner, B.J.Morrow. 2003. "Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents." *J Mol Microbiol Biotechnol.* 5:105-122.
- Shewen,P.E. & B.N.Wilkie. 1982. "Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes." *Infect Immun.* 35:91-94.
- Shoo,M.K. 1989. "Experimental bovine pneumonic pasteurellosis: a review." *Vet Rec.* 124:141-144.

- Shryock, T.R., J.E. Mortensen, M. Baumholtz. 1998. "The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms." *J Antimicrob Chemother.* 41:505-512.
- Suggs, S.V., R.B. Wallace, T. Hirose, E.H. Kawashima, K. Itakura. 1981. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad. Sci U.S A* 78, 6613-6617.
- Sun, Y., K.D. Clinkenbeard, C. Clarke, L. Cudd, S.K. Highlander, S.M. Dabo. 1999. "*Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation." *Vet Microbiol.* 65:153-166.
- Sweeney, M.T., G.W. Brumbaugh, J.L. Watts. 2008. "In vitro activities of tulathromycin and ceftiofur combined with other antimicrobial agents using bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates." *Vet Ther.* 9:212-222.
- Tatum, F.M., R.E. Briggs, S.M. Halling. 1994. "Molecular gene cloning and nucleotide sequencing and construction of an *aroA* mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype A1." *Appl Environ Microbiol.* 60:2011-2016.
- Tatum, F.M., R.E. Briggs, S.S. Sreevatsan, E.S. Zehr, H.S. Ling, L.O. Whiteley, T.R. Ames, S.K. Maheswaran. 1998. "Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence." *Microb. Pathog.* 24:37-46.
- Taylor, C.M. & I.S. Roberts. 2005. "Capsular polysaccharides and their role in virulence." *Contrib. Microbiol.* 12:55-66.
- Thein, S.L., J.R. Lynch, D.J. Weatherall, R.B. Wallace. 1986. Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* 1, 93.
- Then, R.L. & F. Hermann. 1984. "Properties of brodimoprim as an inhibitor of dihydrofolate reductases." *Chemotherapy.* 30:18-25.
- Thornsberry, C., P.J. Burton, Y.C. Yee, J.L. Watts, R.J. Yancey, Jr. 1997. "The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test." *J Dairy Sci.* 80:413-421.
- Tomich, M., P.J. Planet, D.H. Figurski. 2007. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol.* 5, 363-75.
- Trolldenier, H. 1995. "Resistenzbewertung veterinärmedizinisch bedeutsamer bakterieller Erreger 1992." *BgVV-Heft.* 2/1995.
- Varma, K.J., P.E. Adams, T.E. Powers, J.D. Powers, J.F. Lamendola. 1986. "Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves." *J Vet Pharmacol Ther.* 9:412-425.
- Vogel, G., J. Nicolet, J. Martig, P. Tschudi, M. Meylan. 2001. "[Pneumonia in calves: characterization of the bacterial spectrum and the resistance patterns to antimicrobial drugs]." *Schweiz Arch Tierheilkd.* 143:341-350.
- Vogel, G.J., S.B. Laudert, A. Zimmermann, C.A. Guthrie, G.D. Mechor, G.M. Moore. 1998. "Effects of tilmicosin on acute undifferentiated respiratory tract disease in newly arrived feedlot cattle." *J Am Vet Med Assoc.* 212:1919-1924.
- Walker, R.D. 2000. "The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy." *Aust Vet J.* 78:84-90.
- Wallmann, J., H. Kaspar, R. Kroker. 2004. "[The prevalence of antimicrobial susceptibility of veterinary pathogens isolated from cattle and pigs: national antibiotic resistance monitoring 2002/2003 of the BVL]." *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117:480-492.
- Walser, K. & H. Bostedt. 1990. "Kälberkrankheiten, Diarrhoeen." Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart. 304-315.

- Walsh, T.J., S.L.Hansen, B.A.Tatem, F.Auger, H.C.Standiford. 1985. "Activity of novobiocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother.* 15:435-440.
- Walsh, C., 2002. Antibiotics, Actions, Origins, Resistance. ASM Press.
- Wassenaar, T.M. & W.Gaastra. 2001. "Bacterial virulence: can we draw the line?" *FEMS Microbiol Lett.* 201:1-7.
- Watt, J.M., E.Swiatlo, M.M.Wade, F.R.Champlin. 2003. "Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*." *FEMS Microbiol Lett.* 225:9-14.
- Werckenthin, C., A.Bottner, H.M.Hafez, K.Hartmann, M.Kaske, C.Kehrenberg, M.Kietzmann, D.Klarmann, G.Klein, P.Krabisch, T.Kuhn, G.Luhofer, A.Richter, B.Schulz, S.Schwarz, C.Sigge, W.Traeder, K.H.Waldmann, J.Wallmann. 2005. "[Cross-resistance between antimicrobial agents used in veterinary medicine: molecular background and practical consequences for susceptibility testing]." *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 118:471-480.
- Whiteley, L.O., S.K.Maheswaran, D.J.Weiss, T.R.Ames, M.S.Kannan. 1992. "*Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis." *J Vet Intern Med.* 6:11-22.
- Wieler, L.H. & G.Bajer. 1999. "Antibiotika und Resistenzproblematik: hygienische und immunologische Alternativen." *Tierärztl. Prax.* 27:341-347.
- Wikse, S.E. 1985. "Feedlot cattle pneumonia." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1:289-310.
- Wilson, M., J.DeRisi, H.H.Kristensen, P.Imboden, S.Rane, P.O.Brown, G.K.Schoolnik. 1999. "Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12833-12838.
- Wizigmann, G., G.Dirksen, J.v.Sandersleben, O.Geisel, T.Held, A.Mayr. 1976. "Über die Enzootische Bronchopneumonie des Rindes („Rinder Grippe")." *Tierärztl. Umsch.* 31:343-352.
- Yates, W.D. 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.
- Yates, W.D., B.F.Kingscote, J.A.Bradley, D.Mitchell. 1983. "The relationship of serology and nasal microbiology to pulmonary lesions in feedlot cattle." *Can J Comp Med.* 47:375-378.
- Yeang, C.H., S.Ramaswamy, P.Tamayo, S.Mukherjee, R.M.Rifkin, M.Angelo, M.Reich, E.Lander, J.Mesirov, T.Golub. 2001. "Molecular classification of multiple tumor types." *Bioinformatics.* 17 Suppl 1:S316-S322.
- Zecchinon, L., T.Fett, D.Desmecht. 2005. "How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism." *Vet Res.* 36:133-156.

7 Anhang

Tabelle A1 Primer für die *real-time* PCR

Primer	Sequenz
Pamu-108_5topA_RT	TCTGATTTGGCGTCAGTTTGTC
Pamu-109_3topA_RT	CCGCGCGAACCGTAAC
Pamu-110_5gyrA_RT	CGATGTACGCGATGGTTTGA
Pamu-111_3gyrA_RT	CCTTCGTGCATCGCAAATAA
Pamu-112_5lexA_RT	CAAAGATGTGCGTAATGGACAGA
Pamu-113_3lexA_RT	TTCCAAACGCTTGACTGTCACT
Pamu-114_5gyrB_RT	CCAAGAGCGTGATCCTGCAT
Pamu-115_3gyrB_RT	AGCCGCCCGCAGAATC
Pamu-056_3phyA_RT	CCAATATGTTGCTCAATCAGTGTTT
Pamu-057_5phyA_RT	TACAGCATCAATCCTTTACTCTAAAGGA
Pamu-058_5hexD_RT	GCTACGTTCAAATGATGTCGTTACA
Pamu-059_3hexD_RT	GCCATTCGCAGAGAAATTTAC
Pamu-060_5hexB_RT	TCACAGGCTACCCGTTGATG
Pamu-061_3hexB_RT	GGCAGAAACCGCACCAAT
Pamu-064_5recA_RT	CATTGTAGACTCAGTCGCAGCAT
Pamu-065_3recA_RT	CCCATGTGTGAGTCACCCATT

Tabelle A2 Primer für Standard PCR

Primer	Sequenz
Pamu-100_5topA	TCGACAATCGGACCATCA
Pamu_101_3topA	GCGTGTTCAATCTGTTGC
Pamu-102_5gyrA	GGCACATGCTCAAGCATT
Pamu-103_3gyrA	GATTAATGCGGCGGTTGG
Pamu-104_5lexA	CTTGACCGCCAGCTTCTT
Pamu-105_3lexA	GGCGAGATTGTCCTTGCT
Pamu-106_5gyrB	CCGTTAACACCGCCTCAT
Pamu-107_3gyrB	CGCTTGCGTGAATTGTCT
Pamu-054_3phyA	TTCGACGTTGCTCGATCA
Pamu-055_5phyA	GTGCTGAATGTGCATGAG
Pamu-062_5pm0775	GGGTACGCATCATGTCTAAACCA
Pamu-063_3pm0775	GCCCAATGTAATAACCTTTAGCAA
Pamu-066_5recA	GACAACTTGACGGATAGC
Pamu-067_3recA	ACGCCTAACTCGATGAGC
Pamu-068_5hexD	GCTTGCCAAGTGTTGATG
Pamu-069_3hexD	GGATCAGCACGGTTATCT
Pamu-070_5hexC	CTCAGCAGCAGCTAGGTA
Pamu-071_3hexA	TTCCGAGGATACCGACTT
Pamu-072_5pm0775	GTAATTGACGGCGGAATG
Pamu-073_3pm0775	TAGGCTGTCATGGTTGTC
Pamu-116_5gyrA_RT	CCGATGTACGCGATGGTTT
Pamu-117_3gyrA_RT	CCTTCGTGCATCGCAAATAAT
Pamu-118_5gyrA_RT	GGCAAGGTAACCTTCGGTTCAA
Pamu-119_3gyrA_RT	CATGCGGGCTTCAGTATAACG
Pamu-120_5lexA_RT	TGCAGATAAATTACCGAGCCTTT
Pamu-121_3lexA_RT	TGCACGCATTGAGGATGAA

Tabelle A3 Kreuzhybridisierende Probesets von *P. multocida*, welche aus der Datenanalyse ausgeschlossen wurden.

Probeset	Gene ID	Description
bioC_PM_s_at	PM1903	biotin synthesis protein, putative
bioD2_PM_s_at	PM1904	dethiobiotin synthase
cah_PM_s_at	PM1905	carbonic anhydrase
fkIB_PM_g_at		
PM0654_PM_at	PM0654	Hypothetisches Protein
PM0682_PM_at	PM0682	Hypothetisches Protein
PM0901_PM_at	PM0901	Hypothetisches Protein
PM1895_PM_s_at	PM1895	Hypothetisches Protein
PM1897_PM_s_at	PM1897	Hypothetisches Protein
PM1902_PM_s_at	PM1902	Hypothetisches Protein
PM1932_PM_at	PM1932	Hypothetisches Protein
PMrRNA23s_at		
rpL10_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpL15_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpL16_PM_f_at	PM1408	ribosomaler Protein L16
rpL16_PM_i_at	PM1408	ribosomaler Protein L16
rpL20_PM_f_at	PM0604	ribosomaler Protein L20
rpL22_PM_f_at	PM1410	ribosomaler Protein L22
rpL24_PM_f_at	PM1404	ribosomaler Protein L24
rpL28_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpL29_PM_f_at	PM1407	ribosomaler Protein L29
rpL3_PM_f_at	PM1415	ribosomaler Protein L3
rpL33_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpL35_PM_f_at	PM0603	ribosomaler Protein L35
rpL36_PM_f_at	PM1394	ribosomaler Protein L36
rpL5_PM_f_at	PM1403	ribosomaler Protein L5
rpS10_PM_f_at	PM1416	ribosomaler Protein S10
rpS11_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpS12_PM_s_at	PM1354	ribosomaler Protein S12
rpS13_PM_f_at	PM1393	ribosomaler Protein S13
rpS14_PM_f_at	PM1402	ribosomaler Protein S14
rpS20_PM_f_at		ribosomaler Protein
rpS4_PM_f_at	PM1391	ribosomaler Protein S4
rpS5_PM_f_at	PM1398	ribosomaler Protein S5
rpS7_PM_r_at	PM1355	ribosomaler Protein S7
rpS8_PM_f_at	PM1401	ribosomaler Protein S8

Tabelle A4 Kreuzhybridisierende Probesets von *M. haemolytica*, welche aus der Datenanalyse ausgeschlossen wurden.

Probeset	Gene ID	Description
acpP_MH_f_at	MH1225	Acyl carrier Protein (ACP).
bioA_MH_s_at	MH0932	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxonoxaxoate Aminotransferase (EC 2.6.1.62)
bioF_MH_s_at	MH0931	amino-7-oxonoxaxoate Synthase (EC 2.3.1.47)
MH2141_f_at	MH2141	Hypothetisches Protein
MHrRNA16s_s_at		
MHrRNA23s_at		
MHrRNA23s_g_at		
oppD_MH_s_at	MH0925	Oligopeptid Transport ATP-bindungs Protein OPPD.
oppF_MH_s_at	MH0926	Oligopeptid Transport ATP-bindungs Protein OPPF.
proB_MH1_s_at	MH0936	Glutamate-5-Kinase (EC 2.7.2.11)
psd_MH1_s_at	MH0933	Phosphatidylserine Decarboxylase Proenzyme
rpL10_MH_f_at		ribosomaler Protein
rpL14_MH_s_at	MH1067	50S ribosomaler Protein L14.
rpL15_MH_f_at		ribosomaler Protein
rpL20_MH_f_at	MH0757	50S ribosomaler Protein L20.
rpL21_MH_s_at		ribosomaler Protein
rpL22_MH_f_at	MH1361	50S ribosomaler Protein L22.
rpL27_MH_f_at	MH1270	50S ribosomaler Protein L27.
rpL28_MH_f_at	MH1226	50S ribosomaler Protein L28.
rpL29_MH_f_at	MH1358	50S ribosomaler Protein L29.
rpL3_MH_f_at	MH1366	50S ribosomaler Protein L3.
rpL34_MH_f_at	MH1922	50S ribosomaler Protein L34.
rpL35_MH_f_at	MH0756	ribosomaler Protein L35 (rpL35) (HI1319)
rpL4_MH_s_at		ribosomaler Protein
rpL7_L12_MH_f_at		ribosomaler Protein
rpS10_MH_f_at	MH1367	30S ribosomaler Protein S10.
rpS11_MH_f_at	MH1054	30S ribosomaler Protein S11.
rpS13_MH_f_at	MH1055	30S ribosomaler Protein S13.
rpS14_MH_f_at		ribosomaler Protein
rpS18_MH_s_at	MH1344	30S ribosomaler Protein S18.
rpS19_MH_s_at	MH1362	30S ribosomaler Protein S19.
rpS7_MH_f_at		ribosomaler Protein
rpS8_MH_f_at		ribosomaler Protein

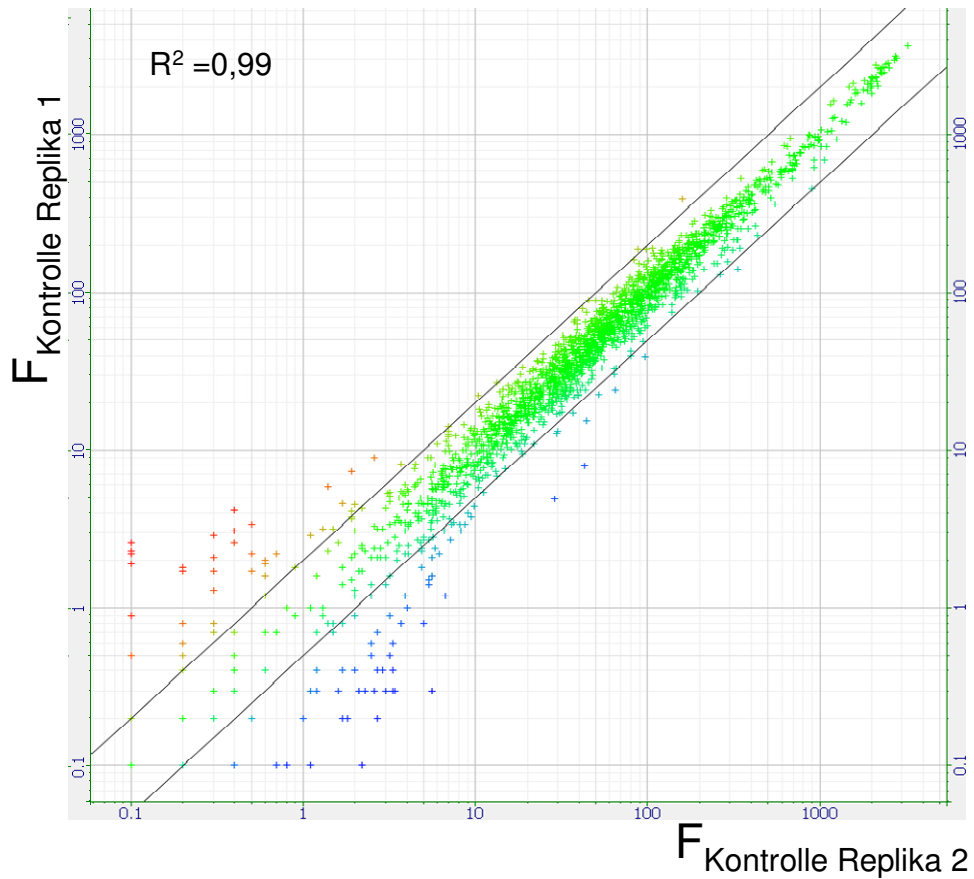


Abb. A1. Scatter Blot Analyse zwei Replikate eines Experiments von *P. multocida*. Die gescannten Fluoreszenzwerte für jedes Gen wurden für die Replika 1 auf der Y-Achse und für die Replika 2 auf der X-Achse aufgetragen. Die Diagonallinien zeigen einen zweifachen Unterschied zwischen den Signalwerten. Der Korrelationskoeffizient (R^2) wurde mit der Software Exel berechnet.

Tabelle A5 *P. multocida* Signaturgene der Antibiotika des Referenzkompendiums.

Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name
Novobiocin		PM0631	<i>pheS</i>	PM1154	<i>dut</i>	PM1880		PM0466	
PM0034	<i>dnaE</i>	PM0636	<i>accD</i>	PM1156		PM1884		PM0489	
PM0053	<i>menF</i>	PM0671	<i>sppA</i>	PM1168	<i>menG</i>	PM1925	<i>rodA</i>	PM0503	
PM0060	<i>era</i>	PM0687		PM1213	<i>merP</i>	PM1926		PM0530	
PM0061	<i>rnc</i>	PM0707	<i>fadD</i>	PM1230	<i>ponA</i>	PM1927	<i>dacA</i>	PM0531	
PM0140	<i>murD</i>	PM0709		PM1277		PM1928		PM0567	<i>gcvA</i>
PM0168	<i>xseA</i>	PM0711		PM1304	<i>kdtB</i>	PM1929	<i>lipB</i>	PM0610	
PM0169		PM0719	<i>nrdB</i>	PM1305	<i>kdtA</i>	PM1930	<i>lipA</i>	PM0621	<i>aspC</i>
PM0174		PM0731	<i>ribH</i>	PM1325		PM1973		PM0643	<i>asnS</i>
PM0176		PM0752	<i>pntB</i>	PM1336		PM1978	<i>lon</i>	PM0670	
PM0181	<i>rnb</i>	PM0790	<i>selD</i>	PM1345		PM1990	<i>cdsA</i>	PM0674	
PM0193		PM0808	<i>arg</i>	PM1368	<i>pepD</i>	PM1991		PM0681	
PM0194	<i>pfs</i>	PM0826	<i>rimK</i>	PM1419	<i>tnaB</i>	PM2010	<i>gcpE</i>	PM0735	
PM0195	<i>pepA</i>	PM0838	<i>hisH</i>	PM1476	<i>gyrB</i>	PM2011	<i>hisS</i>	PM0827	<i>grx</i>
PM0234		PM0841	<i>gyrA</i>	PM1481		PM2012		PM0844	<i>tadF</i>
PM0266		PM0842		PM1485	<i>gidA</i>	Enrofloxacin		PM0845	<i>tadE</i>
PM0269	<i>prc</i>	PM0877	<i>uup1</i>	PM1486	<i>gidB</i>	PM0892	<i>impA</i>	PM0847	<i>tadC</i>
PM0293	<i>guaA</i>	PM0878		PM1488	<i>atpB</i>	Florfenicol		PM0869	<i>ilvH</i>
PM0297		PM0882	<i>nifS_2</i>	PM1492	<i>atpA</i>	PM0091		PM0890	<i>modF</i>
PM0352	<i>fur</i>	PM0887		PM1501	<i>vacJ</i>	PM0927		PM0938	<i>purA</i>
PM0356	<i>seqA</i>	PM0888		PM1511		PM0160		PM1016	<i>wza</i>
PM0359	<i>aroC</i>	PM0889		PM1523		PM1129		PM1053	<i>pur</i>
PM0362	<i>msbB</i>	PM0891		PM1547		Tilmicosin		PM1088	<i>prmA</i>
PM0369	<i>parC</i>	PM0899		PM1548	<i>cysQ</i>	PM0301	<i>rpS15</i>	PM1173	
PM0370	<i>parE</i>	PM0909		PM1549	<i>zwf</i>	PM0410	<i>fdhD</i>	PM1200	<i>hisB</i>
PM0378		PM0910		PM1550	<i>devB</i>	PM0557		PM1362	
PM0458		PM0920	<i>spoT</i>	PM1551		PM0691		PM1469	
PM0461		PM0921	<i>rpoZ</i>	PM1552		PM0789	<i>hemH</i>	PM1519	<i>ftsY</i>
PM0475		PM0951	<i>dcd</i>	PM1553		PM0836		PM1555	
PM0478		PM0952	<i>udk</i>	PM1556	<i>comF</i>	PM0840	<i>ubiG</i>	PM1583	
PM0483		PM0958		PM1561	<i>sun</i>	PM0915	<i>sapF</i>	PM1601	<i>tagI</i>
PM0512		PM0959	<i>hold</i>	PM1587	<i>tehA</i>	PM0925	<i>fadD</i>	PM1644	
PM0516	<i>recB</i>	PM0966		PM1612	<i>surE</i>	PM0984		PM1646	
PM0517	<i>recD</i>	PM0988	<i>rnt</i>	PM1620	<i>gph</i>	PM1450	<i>greB</i>	PM1648	
PM0526		PM0992	<i>rluC</i>	PM1631	<i>pldB</i>	PM1673		PM1656	
PM0551	<i>argS</i>	PM0995	<i>metB</i>	PM1686	<i>ubiE</i>	Trimethoprim		PM1670	<i>rpiA</i>
PM0554	<i>lpp</i>	PM0999		PM1690		PM1190		PM1679	
PM0559		PM1028	<i>ndk</i>	PM1691	<i>tatC</i>	PM1798		PM1680	
PM0573	<i>trxB</i>	PM1029	<i>pepB</i>	PM1701	<i>xerC</i>	PM1451	<i>xynC</i>	PM1681	
PM0574		PM1041	<i>mfd</i>	PM1703	<i>dapF</i>	Brodinoprim		PM1682	
PM0577	<i>trpA</i>	PM1061	<i>ptmA</i>	PM1730	<i>plpB</i>	PM1127		PM1705	<i>trx</i>
PM0585	<i>sohB</i>	PM1098	<i>glyQ</i>	PM1731	<i>glmS</i>	Rifampicin		PM1706	<i>dsbD</i>
PM0588	<i>putP</i>	PM1099		PM1747	<i>coaA</i>	PM0030	<i>nrfF</i>	PM1710	
PM0606		PM1100	<i>ureX</i>	PM1830	<i>mutS</i>	PM0083	<i>ampD</i>	PM1826	
PM0608	<i>kicA</i>	PM1101		PM1840	<i>srmB</i>	PM0211		PM1872	<i>pyrG</i>
PM0609	<i>mukB</i>	PM1102	<i>glyS</i>	PM1856	<i>pssA</i>	PM0402		PM1961	<i>leuB</i>
PM0618	<i>pepN</i>	PM1117	<i>argE</i>	PM1857		PM0418	<i>ner</i>	Cefquinom	
PM0629	<i>pheT</i>	PM1120	<i>argH</i>	PM1875		PM0445			

Tabelle A6 Allgemeine *P. multocida* Stressgene.

Nr.	Gen_ID	Gen-Name	Nr.	Gen_ID	Gen-Name	Nr.	Gen_ID	Gen-Name
1	PM0005	<i>ccmA</i>	34	PM0616		67	PM1187	<i>exbD</i>
2	PM0008	<i>ccmD</i>	35	PM0617	<i>pyrD</i>	68	PM1194	
3	PM0009	<i>ccmE</i>	36	PM0641	<i>bioD1</i>	69	PM1225	<i>comE</i>
4	PM0014		37	PM0650	<i>ribE</i>	70	PM1228	<i>comB</i>
5	PM0023	<i>nrfA</i>	38	PM0666	<i>rsgA</i>	71	PM1240	<i>dnaG</i>
6	PM0025	<i>nrfC</i>	39	PM0667	<i>rsgA</i>	72	PM1299	
7	PM0051	<i>fbpA</i>	40	PM0680	<i>prlC</i>	73	PM1311	<i>tpiA</i>
8	PM0069	<i>pfkA</i>	41	PM0704	<i>ackA</i>	74	PM1313	
9	PM0075	<i>pflB</i>	42	PM0705	<i>pta</i>	75	PM1315	<i>corA</i>
10	PM0085	<i>hofB</i>	43	PM0736	<i>DnaK</i>	76	PM1434	<i>dcuB</i>
11	PM0086	<i>hofC</i>	44	PM0737		77	PM1443	<i>glpT</i>
12	PM0087	<i>hopD</i>	45	PM0738	<i>metC</i>	78	PM1484	<i>mioC</i>
13	PM0088		46	PM0740	<i>dnaJ</i>	79	PM1506	<i>gpmA</i>
14	PM0105		47	PM0741		80	PM1522	
15	PM0132		48	PM0777		81	PM1542	<i>pckA</i>
16	PM0199	<i>frdC</i>	49	PM0778	<i>hexD</i>	82	PM1557	<i>orfG</i>
17	PM0200	<i>frdB</i>	50	PM0780	<i>hexB</i>	83	PM1564	<i>mscL</i>
18	PM0201	<i>frdA</i>	51	PM0806	<i>speF</i>	84	PM1672	
19	PM0209		52	PM0823	<i>fumC</i>	85	PM1693	<i>cysK</i>
20	PM0260	<i>potD</i>	53	PM0832	<i>ptnD</i>	86	PM1704	<i>clpB</i>
21	PM0276	<i>gltA</i>	54	PM0833	<i>ptnC</i>	87	PM1748	<i>hslU</i>
22	PM0278	<i>sucB</i>	55	PM0834		88	PM1749	<i>hslV</i>
23	PM0331	<i>ompW</i>	56	PM0872	<i>hns</i>	89	PM1767	<i>iunH</i>
24	PM0335		57	PM0924	<i>gapdH</i>	90	PM1792	
25	PM0349		58	PM0930	<i>fbp</i>	91	PM1848	<i>scrB</i>
26	PM0350		59	PM1024	<i>htpG</i>	92	PM1858	
27	PM0395		60	PM1074	<i>yhxB</i>	93	PM1871	<i>eno</i>
28	PM0467	<i>dinP</i>	61	PM1080		94	PM1892	
29	PM0481	<i>cspD</i>	62	PM1106	<i>groES</i>	95	PM1895	
30	PM0519		63	PM1107	<i>groEL</i>	96	PM1959	<i>leuD</i>
31	PM0521		64	PM1136		97	PM1974	
32	PM0612		65	PM1152	<i>radC</i>			
33	PM0613		66	PM1186	<i>exbB</i>			

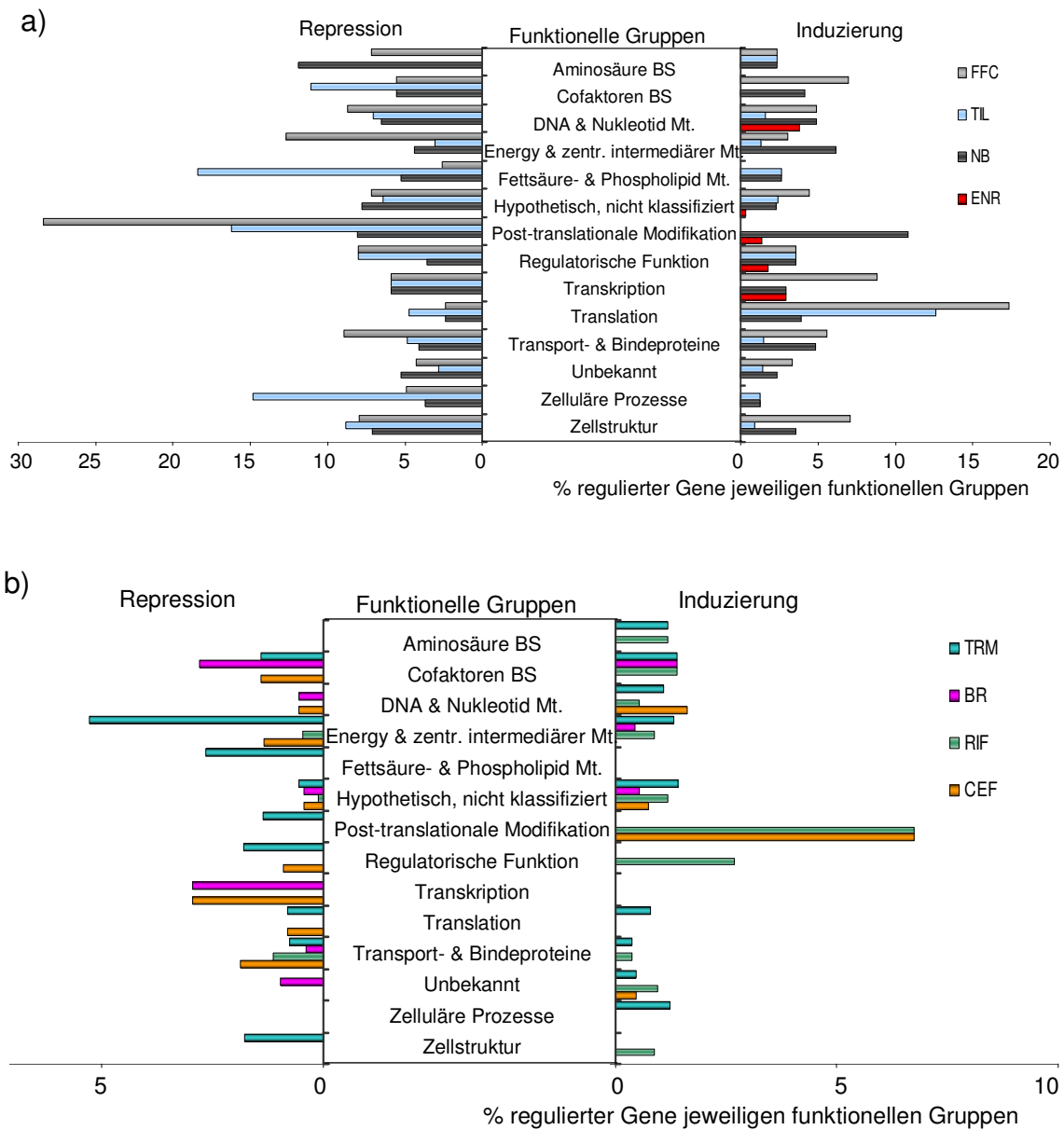


Abb. A2. Einteilung der regulierten Gene von *M. haemolytica* in funktionelle Gruppen. Die regulierten Gene wurden in 14 funktionelle Gruppen eingeteilt. Jeder Strich auf der Abszisse entspricht 10% der regulierten Gene. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Antibiotika mit großer und geringen Wirkung auf das Transkriptom getrennt präsentiert. Metab.-Metabolismus. a) NB: Novobiocin, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, TIL: Tilmicosin; b) TRM: Trimethoprim, BR: Brodimoprim, CEF: Cefquinom, RIF: Rifampicin.

	NB	ENR	FFC	TIL	TRIM	BR	RIF	CEF	Gen-Name	Gen-ID	Annotation
	10'30'	10'30'	10'30'	10'30'	10'30'	10'30'	10'30'	10'30'	wecC	MH1711	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase
									PM1073	MH0016	Possible lipoprotein precursor
									MH2009	MH2009	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase
									neuA	MH2006	acylneuraminate cytidyltransferase
									MH2004	MH2004	pilin glycosylation protein PglB
									neuB	MH2005	N-acetylneuraminic acid synthetase
									MH1926	MH1926	Wzz: O antigen chain length determinant—curated annotation
									attK	MH1074	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]
									radA	MH1544	DNA repair protein
									PM0889	MH0743	conserved protein of unknown function
									PM1617	MH1681	conserved protein of unknown function
									FrpB	MH0980	Fe-regulated protein B (frpB)
									NMB1969	MH0256	Extracellular serine protease precursor
									dam	MH0878	DNA adenine methylase
									PM1113	MH0816	lipoprotein precursor
									MH0218	MH0218	putative virulence protein from the glycine-rich PE-PGRS family
									PM1911	MH1025	Virulence gene protein
									PM0345	MH1597	Virulence gene
									PM1843	MH2452	lipopolysaccharide heptosyltransferase-1
									PM0055	MH1405	Outer membrane lipoprotein A
									neuC	MH2007	N-acetylmannosamine-6-P epimerase
									MH1767	MH1767	<i>putative</i> putative lipoprotein
									MH2586	MH2586	virulence associated protein A
									MH2121	MH2121	ATP dependent protease LA 1
									LBGB	MH0904	LOS biosynthesis enzyme LBGB (LBGB)
									vapC	MH2407	virulence associated protein C
									vppA	MH2406	virulence plasmid protein A
									fur	MH2522	ferric uptake regulation protein
									nagA	MH2246	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
									kdsB	MH1894	3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase
									PM1215	MH0794	conserved protein of unknown function
									afuB	MH2570	ABC-type ferric transport system
									MH2079	MH2079	heme-binding protein A precursor
									PM1711	MH0167	Possible amino sugar epimerase
									nanA	MH0169	n-acetylneuraminate lyase
									ompP4	MH0614	Lipoprotein E precursor
									afuA	MH2571	periplasmic ferric iron-binding protein
									iga1	MH1605	Adhesion and penetration protein precursor
									tonB	MH0701	periplasmic protein TonB
									MH1873	MH1873	putative virulence factor
									lktD	MH2511	leukotoxin secretion protein D
									lktB	MH2510	Leukotoxin secretion ATP-binding protein
									hexC	MH1677	capsule biosynthetic locus
									hipA	MH2162	Outer membrane lipoprotein 1 precursor
									afuC	MH2569	ferric ABC transporter, ATP-binding protein (afuC)
									PM1211	MH0969	possible secreted cysteine protease
									hktE	MH1571	catalase
									glpQ	MH1689	glycerophosphodiester phosphodiesterase
									MH0745	MH0745	Serotype-specific antigen 1 precursor
									PM1190	MH1242	Putative metalloprotease YGGG
									exbD	MH0700	biopolymer transport protein
									exbB	MH0699	biopolymer transport protein
									lktA	MH2509	Leukotoxin A
									yfeA	MH0066	iron (chelated) ABC transporter, periplasmic-binding protein
									MH2239	MH2239	Superoxide dismutase
									MH0879	MH0879	Superoxide dismutase [Mn]
									PM1918	MH1274	anaerobic C4-dicarboxylate transporter
									PM0946	MH1680	conserved protein of unknown function
									ptr	MH2424	Proteinase III precursor
									MH0631	MH0631	lipoprotein—curated annotation
									htrA	MH1851	Probable periplasmic serine protease

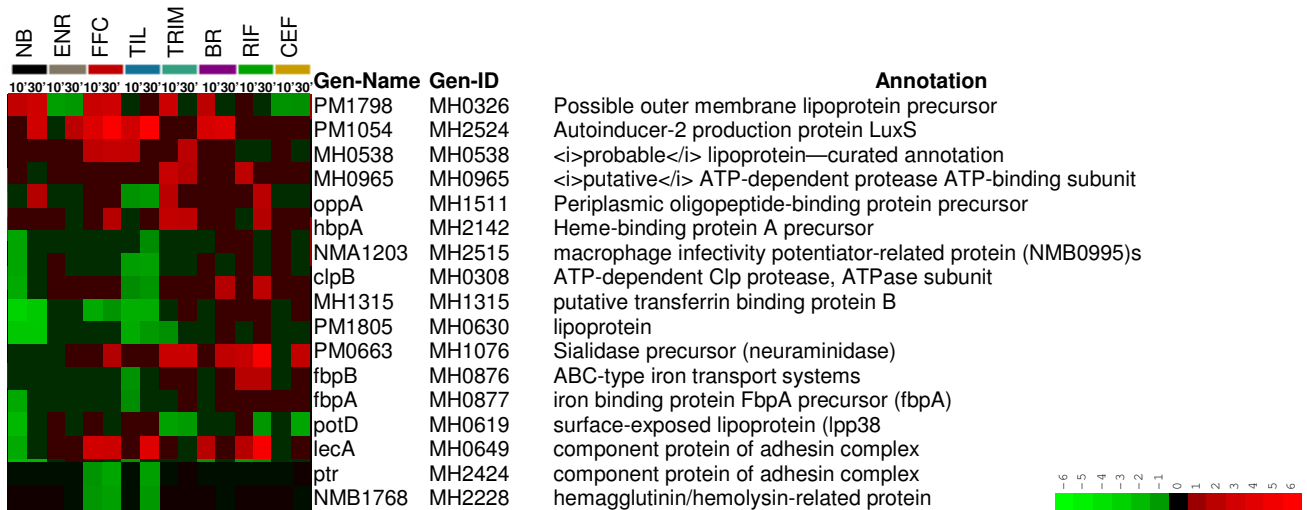


Abb. A3. Regulierte Virulenzgene von *M. haemolytica*. Die Farben kodieren für die Richtung der Regulation (Grün - Reprimierung, Rot - Induzierung)

Tabelle A7 *M. haemolytica* Signaturgene der Antibiotika des Referenzkompendiums.

Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name	Gen-ID	Gen-Name
Novobiocin		Enrofloxacin		MH1332		MH1027	<i>plsX</i>
MH0051		MH0269	<i>recN</i>	MH1334		MH1177	<i>rimM</i>
MH0057		MH0389	<i>uvrD</i>	MH1357	<i>rpS17</i>	MH1179	
MH0058		MH0740		MH1359	<i>rpL16</i>	MH1317	
MH0060		MH0781		MH1400		MH1320	<i>modC</i>
MH0156		MH2285	<i>recA</i>	MH1441		MH1416	<i>firA</i>
MH0195		MH2286	<i>recX</i>	MH1496	<i>rimI</i>	MH1656	
MH0280		MH2287	<i>tex</i>	MH1595		MH1715	
MH0370		MH2288		MH1627	<i>uvrA</i>	MH1726	<i>mukB</i>
MH0392		Florfenicol		MH1647		MH2021	
MH0554	<i>leuD</i>	MH0013	<i>xerD</i>	MH1651		MH2022	
MH0583	<i>uvrB</i>	MH0033		MH1727		MH2432	
MH0728		MH0049		MH1737		MH2586	
MH0729	<i>rbsA</i>	MH0074		MH1763		Trimethoprim	
MH0742	<i>ung</i>	MH0075		MH1774		MH0230	<i>folD</i>
MH0743		MH0096		MH1780	<i>pbp2</i>	MH0361	
MH0797		MH0109		MH1810		MH0592	<i>bioD1</i>
MH0893		MH0110		MH1856	<i>nrfD</i>	MH1121	
MH0894	<i>sapF</i>	MH0188		MH2024		MH1216	<i>fumC</i>
MH0919		MH0538		MH2074		MH2349	
MH1052		MH0566		MH2159	<i>metX</i>	Brodinoprim	
MH1119	<i>hisH</i>	MH0638	<i>tehB</i>	MH2170		MH2216	
MH1120	<i>aroA</i>	MH0777	<i>artI</i>	MH2250	<i>frdC</i>	MH2295	
MH1148	<i>xseB</i>	MH0827	<i>menA</i>	MH2353	<i>leuB</i>	Rifampicin	
MH1183		MH0844		MH2445		MH0178	
MH1184		MH0850		MH2462	<i>gpmA</i>	MH0585	
MH1276	<i>arg</i>	MH0858		MH2507		MH2548	<i>gcvA</i>
MH1295		MH0890	<i>fdhE</i>	MH2524		MH2566	
MH1348		MH0965		MH2591			
MH1469		MH1001	<i>narP</i>	NH1737			
MH1520		MH1039	<i>ureX</i>	Tilmicosin			
MH1662		MH1051	<i>rpoA</i>	MH0028			
MH1681		MH1058	<i>rpL15</i>	MH0081			
MH1733	<i>guaB</i>	MH1069		MH0094			
MH1734		MH1106		MH0125			
MH1735		MH1109	<i>moaC</i>	MH0207			
MH1736	<i>guaA</i>	MH1123		MH0450			
MH1771		MH1129		MH0567	<i>ftsK</i>		
MH2151		MH1130	<i>fecB</i>	MH0571	<i>perM</i>		
MH2168	<i>uup1</i>	MH1139		MH0597			
MH2335		MH1176		MH0658			
MH2367	<i>plp4</i>	MH1194	<i>rpL12</i>	MH0659			
MH2489	<i>sanA</i>	MH1271		MH0805	<i>phoR</i>		
MH2528		MH1328		MH0852			
MH2530	<i>gcpE</i>			MH0906	<i>lon</i>		

Tabelle A8 TZ-regulierte orthologe Gene von *M. haemolytica* und *P. multocida*.

Orthologes Gen ID	<i>M. haemolytica</i>			<i>P. multocida</i>		
	1xMIC 10min	1xMIC 30min	10xMIC 10min	1xMIC 10min	1xMIC 30min	10xMIC 10min
MH0057	PM1562	0,75	0,99	0,97		0,70
MH0524	PM1219	0,77		0,84		0,93
MH1635	PM0468	0,93		1,55		2,28
MH0205	PM1870	0,95		1,26		1,60
MH1572	PM0740	1,17		1,27		1,89
MH0906	PM1978	1,18	0,64	1,48		2,10
MH1574	PM0736	1,19		1,81		2,63
MH0454	PM1106	1,25	1,11	1,42		1,93
MH0455	PM1107	1,26	0,91	1,90		3,09
MH2505	PM1748	1,54		1,35		3,44
MH2504	PM1749	1,62	1,05	1,82		3,45
MH0188	PM1024	1,65	0,91	2,67		3,06
MH0308	PM1704	2,14	1,32	3,72		3,74
MH1507	PM0741	2,52	4,35	4,22		1,11
MH2598	PM1347		0,75			0,71
MH2290	PM1271		0,76	1,67		0,72
MH0486	PM0621		0,79	1,30		0,95
MH1510	PM0396			1,84	0,96	

Tabelle A9 C-30-regulierte Virulenzgene Gene von *P. multocida*.

Gen ID	Relative Expressionswerte (log2)			
	10µM C30		50µM C30	
	10 min	39 min	10 min	30 min
PM1510			-2,30	-4,52
PM0954	-0,91		-2,04	-1,55
PM1918	-2,09		-1,96	
PM0953	-1,02		-1,80	-1,89
PM0956			-1,46	-1,41
PM1444			-1,31	-0,85
PM0625			-1,29	-1,62
PM0624			-1,19	-1,24
PM0776		-0,75	-1,12	-2,40
PM0056	-0,92		-1,07	-2,03
PM0957	-0,75		-1,04	-1,06
PM0057			-1,04	-1,69
PM0774			-0,98	-2,08
PM0556			-0,89	-1,50
PM0261			-0,88	-2,19
PM1229			-0,84	-4,46
PM1064			-0,77	-1,06
PM1484			-0,74	
PM0962			-0,69	-2,53
PM1711	-0,64		-0,67	
PM0464			-0,59	

PM0560			0,62	0,74
PM0561			0,69	0,94
PM0874			0,82	1,27
PM1843			0,89	1,13
PM0051			0,91	2,68
PM0299			1,04	1,75
PM1730			1,18	
PM0076			1,22	2,02
PM0400			1,40	2,39
PM0118	0,79		1,83	1,15
PM0117	1,10		1,92	0,83
PM0926		1,05	2,00	4,67
PM1978	1,77		2,82	2,70
PM0468	2,04		3,35	2,75
PM1749	3,05		3,94	3,36
PM1748	2,83		3,97	3,48
PM0592	1,57		4,35	5,12
PM0032	2,99	1,77	4,85	3,18
PM1704	2,74	1,04	5,05	5,25
PM1186	-1,93	-1,39		0,70
PM1187	-1,68	-1,31		0,81
PM0298	-0,82			0,76
PM0779		-0,76		-2,19
PM0773		-0,75		-1,43
PM0780		-0,74		-2,06
PM1227				-3,78
PM1226				-3,76
PM0086				-3,27
PM1228				-2,83
PM1225				-2,45
PM1113				-1,93
PM0778				-1,71
PM0781				-1,62
PM1556				-1,20
PM1911				-1,11
PM0772				-1,08
PM1222				-0,93
PM1334				-0,67
PM1211				-0,67
PM0622				-0,61
PM1720				0,59
PM1304				0,60
PM1054				0,61
PM0203				0,62
PM1501				0,63
PM0889				0,67
PM0399				0,73
PM1909				0,74
PM1302				0,75
PM0839				0,77
PM0323				0,77
PM1536				0,80
PM0888				0,80
PM1907				0,84

ANHANG

PM1976	0,84
PM0638	0,85
PM0098	0,85
PM1908	0,89
PM0649	0,90
PM1323	0,93
PM1294	0,97
PM0646	0,99
PM0286	0,99
PM0050	1,04
PM1077	1,04
PM1188	1,06
PM0243	1,13
PM1052	1,20
PM1844	1,24
PM0734	1,42
PM0946	1,43
PM1805	1,80
PM0450	1,83
PM1910	1,85
PM0213	3,50
PM1428	3,68
PM0042	4,23

Meine Akademischen Lehrer waren die Dozenten und Professoren:

H. Bisswanger

K. W. Bock

P. Bohley

U. Breyer-Pfaff

M. Duszenko

K. Eisele

G. Gauglitz

F. Gönnerwein

H. Hagenmaier

B. Hamprecht

W. Jäger

G. Jung

E. Lindner

D. Mecke

P. A. Münzel

H. Oberhammer

D. Oelkrug

H. Pommer

H. Probst

O. Rau

K. Reutter

W. Sarrazin

M. Schwarz

P. M. Selzer

J. Strähle

W. Voelter

J. Werringloer

LEBENS LAUF

Name Elena Melnikow
Geburtstag 21. März 1975
Geburtsort Karaganda (Kasachstan)
Familienstand ledig

SCHULBILDUNG

08/1982 – 06/1992 Mittelschule in Karaganda / Abschluss: Mittlere Reife
02/1995 – 12/1996 Albertus-Magnus-Gymnasium in Rottweil / Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

04/1997 – 12/2003 Diplomstudium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
Schwerpunktfächer im Hauptstudium: Biochemie, Toxikologie und Analytische Chemie. Abschluss: Diplom Biochemikerin.
04/2003 – 12/2003 Diplomarbeit mit dem Thema „Identifizierung von Virulenzfaktoren in *Pasteurellaceae*“ an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. M. Duszenko in Kooperation mit der Intervet Innovation GmbH.

PROMOTION

03/2004 – 03/2009 Dissertation mit dem Thema „Analyse der Wirkmechanismen antibakterieller Substanzen in *Pasteurellaceae*“ an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. M. Duszenko in Kooperation mit der Intervet Innovation GmbH.

TÄTIGKEITEN ALS WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT

01/1999 – 06/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft im Labor von Prof. Dr. M. Duszenko an der Eberhard-Karl-Universität in Tübingen, Physiologisch-Chemische Institut.
08/2001 – 10/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft im Labor von Prof. Dr. L. Simpson an der University of California, Los Angeles (UCLA).

MITGLIEDSCHAFTEN IN WISSENSCHAFTLICHEN ORGANISATIONEN

European Association for Cancer Research (EACR)
Deutsche Krebsgesellschaft e.V.

PUBLIKATIONEN

Melnikow, E.; Duszenko, M.; Gunkel, N.; Selzer, P. M. and Ullrich, H. J. A compendium of *Mannheimia haemolytica* transcription profiles reveals ribosomal and DNA gyrase inhibitors as important regulators of virulence genes expression. In Vorbereitung.

Melnikow, E.; Spehr, V.; Warrass, R.; Gunkel, N.; Duszenko M.; Selzer, P. M.; Ullrich, H. J. (2008) A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. *Veterinary Microbiology* 131(3-4):277-92.

Melnikow, E.; Dornan, S.; Sargent, C; Duszenko, M.; Evans, G.; Gunkel, N.; Selzer, P.M. and Ullrich, H. J. (2005) Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under growth conditions mimicking the *in vivo* environment. *Veterinary Microbiology* 110, 255-263.

KONGRESSE

Melnikow, E.; Tran, H. Q.; Duszenko, M.; Gunkel, N.; Selzer, P. M. and Ullrich, H. J. A microarray compendium of antibiotic expression profiles in *Pasteurella multocida*: Implications for drug development and virulence. *58. Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology* (DGHM), 01-04 October, 2006, Würzburg, Germany (Vortrag).

Melnikow, E.; Duszenko, M.; Selzer, P. M. and Ullrich, H. J. Mode of Action of Antimicrobial Agents in *Pasteurellacea*. *Gene Signature Symposium*, 15. March, 2005, Berlin, Germany (Poster).

Melnikow, E.; Roehrig, S. C.; Spehr, V.; Tran, H.; Gunkel, N.; Duszenko, M.; Selzer, P. M. and Ullrich, H. J. The "buy one get one free" approach to comparative transcriptome microarray analysis. *8th Annual Affymetrix User Group Meeting*, 13-15 June, 2005, Dublin, UK (Vortrag).