

6. Zusammenfassung / Summary

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) ist ein bedeutender Erreger einer kontagiösen Pleuropneumonie beim Schwein. Die Fähigkeit, wirtseigenes Transferrin als einzige Eisenquelle zu nutzen, gilt dabei als wichtiger Pathogenitätsfaktor. Die Bindung von Transferrin erfolgt bei *A. pp.* durch zwei Proteine von etwa 60 und 100 kDa. Das 60 kDa Protein (TfbA) ist bei den einzelnen Serotypen sehr unterschiedlich und ruft als Antigen eine Serotyp-spezifische, protektive Immunantwort hervor.

In dieser Arbeit wird das 100 kDa Protein von *A. pp.* Serotyp 7 (AP205) charakterisiert und als TfbB bezeichnet. Das klonierte *tfbB*-Gen liegt unmittelbar stromabwärts des *tfbA*-Gens und scheint mit diesem zusammen ein Operon zu bilden. Das TfbB kann in der äußeren Membran von *E. coli* exprimiert werden und bindet spezifisch porcines Transferrin. Diese Fähigkeit geht nach Denaturierung durch SDS-PAGE und Elektro-Blot verloren.

Antikörper gegen das rekombinante Proteinaggregat des TfbB erkennen im Western Blot mit gleichbleibender Intensität ein etwa 100 kDa Protein in den *A. pp.*- Serotypen 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 und ein etwa 103 kDa Protein in den *A. pp.*- Serotypen 1, 3, 5A und 12. Im Southern Blot zeigen die *A. pp.*- Serotypen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 unter hohen Stringenzbedingungen das gleiche Hybridisierungsmuster wie *A. pp.* AP205 im Hinblick auf die Fragmente, die Anteile des *tfbB*-Gens beinhalten; die *A. pp.*- Serotypen 5A und B weisen ein anderes Muster auf. Die Homologie bei der vergleichenden Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz beträgt 95 % mit dem TfbB von *A. pp.*- Serotyp 1 und über 40 % mit den großen Transferrin bindenden Proteinen von *Neisseria gonorrhoeae* und *Haemophilus influenzae*.

Antikörper von Tieren, die mit dem gelösten TfbB-Aggregat immunisiert worden sind, erkennen im ELISA das TfbB-Aggregat, nicht jedoch das funktionell aktive TfbB in der äußeren Membran rekombinanter *E. coli*. Umgekehrt binden Antikörper von Tieren, die mit TfbB-haltigen Membranen rekombinanter *E. coli* immunisiert wurden, das funktionell aktive TfbB in Membranen, nicht jedoch das Proteinaggregat.

Aus einem ersten Tierexperiment ergeben sich Hinweise auf eine mögliche protektive Wirkung TfbB-haltiger äußerer Membranen von rekombinanten *E. coli* gegen die schwerwiegenden Folgen einer Infektion mit *A. pp.* Serotyp 7.

**Cloning and characterization of a 100 kDa transferrin binding protein from
Actinobacillus pleuropneumoniae.**

(Markus Wilke)

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) is an important respiratory tract pathogen in swine. The ability to utilize porcine transferrin as the only source of iron is a well-known virulence factor. The binding of transferrin is mediated by two proteins of approximately 60 and 100 kDa. The 60 kDa protein has been shown to be highly divergent among different serotypes and to induce a serotype specific protective immune response.

In this study we characterized the 100 kDa transferrin binding protein of *A. pp.* serotype 7 (AP205) and designated it as TfbB. The *tfbB* gene was found to be located immediately downstream of the *tfbA* gene. It was cloned and sequenced and appears to be located on one operon together with the *tfbA*-gene. The TfbB protein was expressed in *E. coli* outer membranes in a conformation eliciting porcine transferrin-specific binding activity. The transferrin binding ability is lost due to denaturation after SDS-PAGE and electro-blot.

Antibodies raised against the recombinant aggregated protein detected in a Western Blot, with constant intensity, a 100 kDa protein in *A. pp.*- serotypes 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 and 11, and a polypeptide of approximately 103 kDa in *A. pp.*- serotypes 1, 3, 5A and 12. In a Southern Blot homologous DNA sequences were detected in all *A. pp.*- serotypes under high-stringency washing conditions. *A. pp.*- serotypes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 showed the same hybridization pattern as *A. pp.* AP205 with respect to the fragments containing parts of the *tfbB*-gene. *A. pp.*- serotypes 5A and 5B showed a different pattern. Comparative analysis of the deduced amino acid sequence revealed 95 % identity with the TfbB from *A. pp.*- serotype 1 and more than 40% identity with the large transferrin binding proteins from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*.

Antibodies from pigs immunized with the solubilized recombinant TfbB-aggregate recognized isolated TfbB-aggregate but not functional membrane-associated TfbB protein, whereas antibodies from pigs immunized with TfbB-containing *E. coli* membranes recognized functional membrane-associated TfbB only.

A preliminary animal experiment indicated the protective efficacy of recombinant membrane-associated TfbB against the severe consequences of an infection with *A. pp.* serotype 7.