

6. Zusammenfassung

Actinobacillus pleuropneumoniae (A. pp.), der Erreger der kontagiösen Pleuropneumonie des Schweines, verursacht perakute, akute und chronische Infektionen der Lunge. Die sich nach überstandener Infektion oder durch Immunisierung entwickelnde humorale Immunität schützt zwar vor dem Auftreten klinischer Erscheinungen, rekonvaleszente Tiere bleiben jedoch häufig persistierend infiziert und tragen so entscheidend zur Verbreitung des Erregers bei.

Diese Eigenschaft des Erregers veranlaßte uns, Variationen der Antigenexpression von A. pp im Rahmen der Wirt-Erreger-Wechselbeziehungen im Verlauf einer Infektion zu untersuchen. Hierzu wurde erstmals erfolgreich ein *In-vitro*-Modell entwickelt, in dem infektionsstadienspezifische bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten von Schweinen A. pp-Kulturen zugesetzt wurden. Diesem Wachstumsversuch schloß sich eine zweidimensionale Gelelektrophorese an.

Mit Hilfe der Western Blot- und Autoradiographie-Technik wurde dargestellt, daß A. pp auf den Zusatz von BALF mit einer verstärkten Expression zahlreicher Proteine reagiert. Dies erfolgte besonders intensiv nach Zusatz von BALF A. pp-infizierter Schweine. Desweiteren wurde ein Protein (P 6) detektiert, welches erstmalig nach Zusatz von BALF akut infizierter Schweine exprimiert und mit BALF chronisch kranker Schweine wieder herabreguliert wurde. Die Expression des Transferrin bindenden Proteins A (TfbA) von A. pp., welches *in vitro* nur unter Eisenmangelbedingungen verstärkt exprimiert wird, wurde durch den Zusatz von BALF generell und besonders in Anwesenheit von BALF aus der akuten Infektionsphase deutlich verstärkt gebildet und mit BALF aus dem chronischen Stadium der Erkrankung wieder signifikant herabreguliert. Dieses Phänomen zeigt sich unabhängig von der vorhandenen Eisenmenge, wodurch ein anderes Signal als eine Eisenmangelsituation (*in vitro* und *in vivo*) für die Regulation der TfbA-Expression verantwortlich gemacht werden muß. Desweiteren wurde ermittelt, daß die Lipopolysaccharide von A. pp wie das TfbA ebenfalls schon durch den Zusatz von BALF gesunder Schweine verstärkt exprimiert wurden, daß ihre Expression mit BALF der akuten Infektion weiter ansteigt dann aber anders als beim TfbA mit BALF aus der chronischen Phase eine nochmalige Zunahme findet. Für die Expression eines erstmalig dargestellten Hitzeschockproteins von A. pp. (HSP 60) wurde ein dem der LPS-Modulationen entsprechender Verlauf beobachtet. Im Gegensatz dazu blieb die Expression eines 'outer membrane lipoprotein antigens' (OmlA) und das Fettsäuremuster von A. pp durch den Zusatz von BALF unbeeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig durch den Einsatz von infektionsstadienspezifischer BALF in einem *In-vitro*-Modell gezeigt werden, daß die bakterielle Antigenexpression von A. pp durch die Anwesenheit von BALF infektionsstadienspezifisch moduliert wird. Das hier etablierte *In-vitro*-Modell kann (möglicherweise sogar erreger- und wirtsübergreifend) zur Klärung von Bakterien-Wirts-Interaktionen, sowie den Ursachen einer Persistenzbildung von Infektionserregern genutzt werden und zur Klärung des Einflusses von Mischinfektionen beitragen. Zurückführend auf den Titel dieser Arbeit hat also bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit von Schweinen einen weitreichenden Einfluß auf die Antigenexpression von A. pp. *in vitro*

Summary

Influence of bronchoalveolar lavage fluid of pigs on the antigen expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae in vitro*

Bettina Teutenberg-Riedel

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) causes peracute, acute and chronic forms of the contagious porcine pleuropneumonia. Although natural infection and immunization are leading to humoral immunity, which is protecting against clinical symptoms, convalescent pigs often become carriers of the persisting pathogen and are responsible for the dissemination of the disease.

This characteristic of the pathogen led us to examine variations of the antigen expression caused by the host-pathogen-relationship during the course of infection. According to this an *in vitro* model was successfully established for the first time, in which infection stage specific bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from pigs was added to *A. pp.*-cultures. This experiment was followed by a two-dimensional gelelectrophoresis.

Using the Western Blotting and autoradiography it was possible to show, that *A. pp.* is reacting with an increasing expression of numerous proteins, if growing in the presence of BALF. This reaction was most intense after addition of BALF from a *pp.*-infected pigs. A new protein (P 6) was detected, which was expressed with BALF from the acute stage of infection for the first time and which was downregulated again with BALF from chronically infected pigs. The expression of the transferrin binding protein A (TfBA) of *A. pp.*, which normally is known to be upregulated under iron-deficient conditions *in vitro*, was already increasing due to the addition of any BALF, but especially strong after addition of BALF from the acute stage of infection and was significantly downregulated while adding BALF from the chronic stage of disease. This phenomenon was independent from the available amount of iron, which implies, that (*in vitro* and *in vivo*) a signal other than an iron-deficient situation must exist for the regulation of the TfBA-expression. Furthermore it was discovered that the lipopolysaccharides of *A. pp.* (like the TfBA) were upregulated by the addition of BALF from healthy pigs and that the presence of BALF from the acute stage is increasing the amount further. But in the case of the LPS the expression is becoming even more with BALF from the chronic stage. The expression of a heat shock protein of *A. pp.*, which was shown for the first time, was modulated in the same way as that of the LPS. In contrast, the expression of an 'outer membrane lipoprotein antigen' (OmlA) and the fatty acid composition of *A. pp.* was not influenced by the addition of BALF.

In the work presented here, it was possible to show for the first time that the bacterial antigen expression is modulated infection stage specifically by using BALF from different stages of disease in an *in vitro* model. This established *in vitro* model could be used (perhaps even for other pathogens and hosts) for the exploration of the interactions between the host and the pathogen and the reasons for the origin of bacterial persistence. Thus, coming back to the title of the work presented here, the bronchoalveolar lavage fluid of pigs has a far-reaching influence on the antigen expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae in vitro*.