

6 Zusammenfassung / Summary

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*), der Erreger der wirtschaftlich bedeutsamen porcinen Pleuropneumonie, ist für das Schwein obligat pathogen. Die Fähigkeit, seinen Eisenbedarf durch Bindung von wirtseigenem Transferrin zu decken, gilt als wichtiger Virulenzfaktor. Die Expression der transferrinbindenden Proteine TfbA und TfbB wird durch Eisenmangel induziert. Die molekularen Mechanismen der Expression der transferrinbindenden Proteine waren bisher völlig unbekannt.

In dieser Arbeit wurde bewiesen, daß die Gene der transferrinbindenden Proteine auf einer polycistronischen mRNA kodiert sind. Der Transkriptionsstartpunkt liegt über 1300 Basenpaare stromaufwärts des *tfbA*-Startkodons, auf diesen 1300 Basenpaaren befindet sich ein weiterer offener Leserahmen („*toIQ*“). Die Transkriptionsinduktion wird nicht durch den *E. coli*-Repressor Fur (Ferric uptake regulation) beeinflusst. Das *tfbAB*-Operon zeigt damit eine völlig andere Organisation als die Gene transferrinbindender Proteine anderer Spezies. Mit Hilfe eines Reportersystems mit Alkalischer Phosphatase wurde ein posttranskriptorischer Regulationsmechanismus gefunden: Als verantwortlich wurde der mit dem Terminationsfaktor Rho von *E. coli* zu 83,8% identische Faktor RhoAP auf dem *A. pp.*-Genbankplasmid pFR100 identifiziert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß RhoAP die mRNA einer *tfbA-phoA*-Fusion in *E. coli* durch Bindung an die 5'-untranslatierte Region stabilisierte, was zu einer sechsfach stärkeren Expression des TfbA-PhoA-Fusionsproteins führte. Das Bakterium kann also trotz eines relativ geringen Aufwandes auf Transkriptionsebene massiv auf Veränderungen in der Umwelt reagieren, indem die neu synthetisierte mRNA durch den konstitutiv exprimierten RhoAP-Faktor stabilisiert und damit ihre Translation amplifiziert wird.

Mit RhoAP ist möglicherweise ein Protein gefunden worden, das die initial auf Transkriptionsebene regulierte Expression verschiedener Virulenzfaktoren potenziert.

**Molecular mechanisms of the iron induced expression of transferrin binding proteins
from *Actinobacillus pleuropneumoniae*.**

(Svenja Thiede)

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) is the etiological agent of the economically important porcine pleuropneumonia. The ability to utilize porcine transferrin as a source of iron is considered to be an important virulence mechanism. The expression of the transferrin binding proteins TfbA and TfbB is induced by iron restriction. The molecular mechanisms responsible for the expression of the *A. pp.* transferrin binding proteins has been completely unknown, so far.

In this study it is shown that the genes encoding the transferrin binding proteins are located on a polycistronic mRNA. The transcriptional start site is located more than 1300 base pairs upstream of the *tfbA* start codon, and an additional open reading frame („*toIQ*“) has been identified on these 1300 base pairs. Induction of transcription is not repressed by *E. coli* Fur-factor (Ferric uptake regulation). Thus, the *tfbAB*-operon is organized in a completely different manner as genes of transferrin binding proteins from other species. By using a reporter gene system with alkaline phosphatase a novel posttranscriptional regulatory mechanism was identified: The peptide RhoAP, which has an identity of 83,8% with the *E. coli* transcription termination factor Rho, has been cloned and characterized on the *A. pp.* gene bank plasmid pFR100 as the responsible factor. It has been shown that RhoAP stabilizes the mRNA of the *tfbA-phoA*-fusion in *E. coli* by binding to the 5' untranslated region, resulting in a six-fold increased expression of the TfbA-PhoA-fusion protein. Thus, the bacterium manages to respond to changes in the environment with a low expense on the transcriptional level by employing the constitutively expressed RhoAP-factor as an mRNA stabilizing translational amplifier. Possibly, with RhoAP a protein has been identified, that increases the expression of different virulence factors, initially regulated on the transcriptional level.