

6 Zusammenfassung / Summary / Резюме

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) ist der für das Schwein obligat pathogene Erreger der porcinen Pleuropneumonie, einer kontagiösen Lungenerkrankung, die in der industrialisierten Schweinehaltung große Verluste verursacht. Ein besonderes Problem stellen dabei die deutlichen antigenen Unterschiede zwischen den 12 bekannten Serotypen dar, die die Induktion einer serotypübergreifenden protektiven Immunantwort erschweren. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine erste Genomkarte von *A. pleuropneumoniae* zu erarbeiten, sowie die Anwesenheit und die Lokalisation von verschiedenen Genen in *A. pleuropneumoniae* Serotyp-Referenzstämmen zu vergleichen, um so die Basis für weitergehende grundlegende Untersuchungen zur Pathogenese der porcinen Pleuropneumonie zu schaffen.

Die erste Genomkarte von *A. pleuropneumoniae* AP76 Serotyp 7 mit einer mittleren Auflösung von 100 kb wurde mit den Enzymen *Apal*, *Ascl*, *NotI* und *SaII* erstellt. Es wurde ermittelt, daß *A. pleuropneumoniae* ein einzelnes zirkuläres Chromosom besitzt. Große extrachromosomale Replikons wurden nicht nachgewiesen. Als Größe des *A. pleuropneumoniae* AP76 Chromosoms wurden 2,4 Mbp ermittelt. In dieser Karte sowie in den *Apal*- und *NotI*-Makrorestriktionsmustern der 12 *A. pleuropneumoniae* Serotyp-Referenzstämme wurden bekannte virulenzassoziierte Gene (*apx*, *omlA*, *sodA*, *tfbA*, *ureC* und „*repeat*“) sowie einige Haushaltsgene (*glyA*, *metJ*, *recA* und *rhoAP*) positioniert. Es konnte festgestellt werden, daß die virulenzassoziierten Gene über etwa die Hälfte des *A. pleuropneumoniae* AP76 Chromosoms verteilt sind. Das Urease-Operon wurde zusammen mit der *tolQ-tfbB-tfbA*-Region positioniert. Das Transposon-ähnliche Element „*repeat*“ wurde jeweils in einem Fragment mit den Genen *apxIIICA* und *apxIBD* gefunden.

Beim Vergleich der Referenzstämme zeigte eine Sonde für ein bestimmtes Gen in verschiedenen Typstämmen überwiegend ein Signal mit Banden vergleichbarer Größe, wobei die Größendiversität von korrespondierenden *Apal*-Makrorestriktionsfragmenten geringer war als die der *NotI*-Fragmente. Mit Ausnahme vom Referenzstamm für Serotyp 10 kam die „*repeat*“-Sequenz bis zu dreimal je Chromosom vor. Im Gegensatz dazu war im Serotyp 10 Referenzstamm kein „*repeat*“ nachweisbar. Bei den anderen Serotyp-Referenzstämmen war die „*repeat*“-Sequenz immer im selben Fragment wie die *apxIIICA*-Gene zu detektieren. Weiterhin konnte die „*repeat*“-Sequenz bei den Serotyp-Referenzstämmen 2, 7 und 12 in demselben Fragment wie die *apxIBD*-Gene ermittelt werden. Die Verteilung dieses „*repeat*“-Elementes unterstützte die Hypothese, daß ein Transposon-gesteuerter horizontaler Gentransfer an der Entstehung von Toxin-bildenden *A. pleuropneumoniae* Stämmen beteiligt war.

Construction of the first genomic map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and comparative macrorestriction mapping of 12 reference strains

(Denis V. Konine)

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, a severe, contagious pulmonary disease of pigs that causes severe economic losses in the industrialized pig production worldwide. A particular problem is caused by the clear antigenic differences among the 12 serotypes known, which renders the induction of a non serotype specific protective immune response more difficult. Therefore, the purpose of this study was to construct a genomic map of *A. pleuropneumoniae* and to compare the presence and location of a panel of genes in the *A. pleuropneumoniae* serotype reference strains in order to facilitate future investigations on the pathogenesis of porcine pleuropneumonia.

A combined physical and genetic map of the genome of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 strain AP76 with a mean resolution of about 100 kbp was constructed using the restriction endonucleases *Apal*, *Ascl*, *NotI* and *Safl*. The chromosome was found to be singular and circular. Large extrachromosomal replicons could not be detected. The chromosome size of *A. pleuropneumoniae* AP76 was determined to be 2.4 Mbp. Putative virulence associated genes (*apx*, *omlA*, *sodA*, *tbpBA*, *ureC* and "repeat") and house keeping genes (*glyA*, *metJ*, *recA*, *rhoAP*) were positioned on the physical map of strain AP76 and located on the *Apal* and *NotI* fragments of *A. pleuropneumoniae* serotype reference strains. The virulence associated genes are distributed over half of the *A. pleuropneumoniae* AP76 chromosome. The transposon like sequence "repeat" was detected twice in the chromosome together on the same fragment with *apxIIICA* and *apxIBD*, respectively. The urease operon was mapped together with the *tolQ-tbpB-tbpA* region in one fragment.

Southern blot analysis of *A. pleuropneumoniae* serotype reference strains showed that using the more frequently cleaving enzyme *Apal* predominantly fragments with comparable sizes were hybridized. In the *NotI* digest hybridizing fragments were found to be more variable in size. The "repeat" sequence was detected in all reference strains in up to three copies. Only the serotype 10 reference strain had no "repeat" sequence. The "repeat" consistently mapped together with the *apxIIICA* toxin genes in the serovar reference strains. The *apxIBD* gene was also found to be associated with a "repeat" sequence in serotypes 2, 7, and 12. The distribution of this repeat element supported the hypothesis that a transposon mediated horizontal gene transfer mechanism contributed to the evolution of toxinogenic *A. pleuropneumoniae* strains.