

2 Literaturübersicht

2.1 *Mannheimia haemolytica*

2.1.1 Einführung

Mannheimia (M.) haemolytica (früher: *Pasteurella [P.] haemolytica*) gilt als Hauptverursacher der Enzootischen Bronchopneumonie (EBP), einer der bedeutendsten respiratorischen Erkrankungen bei Rind und Schaf, die aufgrund hoher Morbidität, enormen Kosten für Präventiv- und Therapiemaßnahmen sowie direkten Tierverlusten v.a. in Nordamerika und Westeuropa zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in der Rinder- und Schafproduktion führt. Obwohl die EBP bei Rind und Schaf durch komplexe Interaktionen verschiedener bakterieller (*P. multocida*, *Haemophilus sommus* und *Mycoplasma* spp.) und viraler Erreger (Parainfluenza-3-Virus, Bovines respiratorisches Synzitialvirus, Bovines Herpesvirus Typ I) in Verbindung mit Management-assoziierten und klimatischen Stressfaktoren entsteht, wird *M. haemolytica* als primärer bakterieller Erreger bei der Entstehung der klinischen Symptome und pathophysiologischen Vorgänge angesehen. Sowohl die Isolierung von Reinkulturen aus pneumonisch veränderten Lungen als auch die Möglichkeit der experimentellen Reproduktion des Krankheitsgeschehens durch endobronchiale, intratracheale oder intrapulmonale Applikation von *M. haemolytica* Serotyp 1 belegen die obligate Pathogenität des Bakteriums [58, 100, 157, 326]. Während die EBP bei Rindern vermutlich in erster Linie durch *M. haemolytica*-Serotyp A1, und in den letzten Jahren in Deutschland zunehmend auch durch A6-Isolate hervorgerufen wird, findet man bei Schafen Vertreter aller Serotypen mit einer erhöhten Prävalenz der Serotypen A2 bzw. A5-7.

Obwohl der obere Respirationstrakt von Rind und Schaf mit verschiedenen der insgesamt 12 *M. haemolytica*-Serotypen latent infiziert ist, führt nur die massive Proliferation bestimmter Serotypen (A1 und A6 beim Rind, A2, A5-7 beim Schaf) – u.a. durch die Verdrängung der dort latent ansässigen Stämme im Sinne eines bislang ungeklärten „Serotyp-Shifts“ – zur Infektionskrankheit [120]. Es erfolgt eine Besiedlung der unteren Atemwege bis hin zu den Alveolen. Nach derzeitigem Wissenstand sind die wichtigsten Virulenzfaktoren das Leukotoxin (s. Kap. 2.1.4.7) und das Lipopolysaccharid (s. Kap. 2.1.4.3). Die Wirkung v.a. dieser beiden Faktoren sind eine Mastzelldegranulation, die Aktivierung des Komplementsystems, die Freisetzung von Zytokinen, sowie schließlich eine Infiltration der Alveolen und die Lysis von

neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Die massiven Entzündungen tragen zum typischen Bild der fibronektrosierenden Pneumonie bei, die je nach Umfang einen letalen Verlauf nehmen kann [58, 69, 157]. Dem Leukotoxin als best erforschtem Virulenzfaktor von *M. haemolytica* stehen zahlreiche weitere Virulenzdeterminanten gegenüber, deren pathogenetische Bedeutung nur bruchstückhaft bekannt ist. Limitierende Faktoren in der Erforschung der Pathogenese der EBP waren in der Vergangenheit v.a. die fehlende Sequenzanalyse des *M. haemolytica*-Genoms sowie die Schwierigkeit der Etablierung von Tiermodellen. Erst in den letzten Jahren konnten durch die fortschreitende Entschlüsselung des Genoms weitere Faktoren bei *M. haemolytica* identifiziert werden, die zumindest zum Teil Aufschluß über die Pathogenese geben. Nach wie vor bestehen jedoch große Wissenslücken bezüglich der Pathogenesemechanismen des Mikroorganismus, die auch der Grund dafür sind, dass bis heute weltweit noch keine effizienten Impfstoffe gegen eine *M. haemolytica*-Infektion zur Verfügung stehen. Auch liegen keine aktuellen epidemiologischen Untersuchungen über die Bedeutung der einzelnen Serotypen vor.

2.1.2 Einordnung der Gattung *Mannheimia* unter taxonomischen, biotypischen und serologischen Gesichtspunkten

Mannheimia ist ein neues Mitglied der Familie der *Pasteurellaceae* Pohl 1981 *fam. nov.*, einer großen Gruppe Gram-negativer, fakultativ anaerober, unbeweglicher, fermentativer Stäbchenbakterien von 0,2 – 0,4 µm Breite und 0,4 – 2 µm Länge. Während die Familie ursprünglich die Gattungen *Pasteurella*, *Haemophilus* und *Actinobacillus* vereinte, kamen später die neu definierten Gattungen *Mannheimia*, *Histophilus* und *Gallibacterium* sowie die relativ unbeachtete Gattung *Lonepinella* hinzu, so dass die *Pasteurellaceae* derzeit aus mindestens sieben Gattungen bestehen [7, 50, 239, 252]. Die Speziesbezeichnung [*P.*] *haemolytica* wurde erstmals 1932 für Bakterien vorgeschlagen, die eine Pneumonie bei Kälbern auslösten und zuvor bereits in einer Studie zur serologischen Differenzierung boviner Pasteurellen als atypische, d.h. Hämolyse-positive und Indol-negative Stämme von den bis dahin bekannten *P. multocida*-Isolaten abgegrenzt wurden. Basierend auf der Fähigkeit, Arabinose bzw. Trehalose zu fermentieren, wurden bei [*P.*] *haemolytica* die Biotypen A und T differenziert.

Ausgedehnte phänotypische Untersuchungen führten in den achtziger Jahren zur Einteilung von [*P.*] *haemolytica*-Wiederkäuerisolaten in 12 Biogruppen. DNS:DNS-Hybridisierungen zeigten wiederum, dass einige dieser Biogruppen separate Spezies repräsentierten und, dass

die [*P.*] *haemolytica sensu stricto*-Gruppe (Biogruppe 1) nur aus L-Arabinose-negativen Isolaten besteht [9, 224, 225, 231, 285, 295]. Die vor allem an kleine Wiederkäuer adaptierten Trehalose-positiven [*P.*] *haemolytica*-Stämme (Biotyp T [Serotypen T3, T4, T10 und T15]) stellen eine separate Spezies dar, die in *P. trehalosi* umbenannt wurde, obwohl diese Stämme keine enge Zugehörigkeit zur Gattung *Pasteurella* aufweisen [19, 297]. Die Auswertung von Ribotyping-, Multilokus-Enzym-Elektrophorese (MLEE-), 16S rRNS-Sequenzanalyse- und DNS-DNS-Hybridisierungs-Daten führte auch zur Reklassifizierung des Trehalose-negativen Komplexes von [*P.*] *haemolytica* (Biotyp A) in eine zu Ehren von Walter Mannheim als *Mannheimia gen. nov.* bezeichnete neue Gattung. Diese umfasst derzeit neben noch unbenannten Taxa die fünf Spezies *M. haemolytica* (Serotypen A1, A2, A5-9, A12-14, A16, A17), *M. glucosida* (Serotyp A11), *M. granulomatis*, *M. ruminalis* und *M. varigena* [9].

In dieser Arbeit erfolgt die Bezeichnung der Spezies als *M. haemolytica* bzw. [*P.*] *haemolytica* entsprechend der in den zitierten Artikeln verwendeten Literatur. Eine synonyme Verwendung der beiden Spezies-Bezeichnungen wäre nicht korrekt, da [*P.*] *haemolytica* nicht grundsätzlich gleichbedeutend mit *M. haemolytica* ist, wie den Ausführungen dieses Kapitels zur Taxonomie zu entnehmen ist.

2.1.3 Bedeutung von *Mannheimia* spp. als Infektionserreger

Mannheimia haemolytica gilt als primärer Verursacher der EBP bei Rind und Schaf, und wird darüber hinaus regelmäßig isoliert bei septikämischen Geschehen beim Lamm sowie bei Mastitiden beim Schaf. Einige der für *M. haemolytica* beschriebenen Serotypen sind wahrscheinlich Teil der residenten Mikroflora des oberen Respirationstraktes beim Wiederkäuer [107]. *M. glucosida* gehört zur Normalflora der oberen Luftwege des Schafes. Typisierbare Stämme innerhalb der Spezies *M. glucosida* gehören alle dem Serotyp 11 an und stammen i.d.R. vom Schaf, es wird aber auch von Isolaten vom Rind berichtet. Normalerweise ist diese Spezies nicht mit Erkrankungen assoziiert. Während *M. granulomatis* in der Vergangenheit aus verschiedenen pathologischen Läsionen beim Wild und Rind isoliert wurde stammen alle bislang isolierten Stämme der früher als *A. lignieresii* bezeichneten Spezies *M. ruminalis* vom Pansen des Schafes oder Rindes und sind bisher ohne Assoziation mit klinisch Erkrankungen beschrieben worden. *M. varigena*-Stämme schließlich wurden sowohl vom Schwein als auch vom Wiederkäuer isoliert und verursachen dort eine Vielzahl von unterschiedlichen Krankheitsbildern bei diesen Wirtstieren, die Tab. 1 zu entnehmen sind.

Tab. 1: Erkrankungskomplexe hervorgerufen durch *Mannheimia* Spezies [9]

Erkrankungskomplex	Spezies	Betroffene Tierarten
Enzootische Bronchopneumonie Septikämie Mastitis	<i>M. haemolytica</i>	Rind (v.a. Serotyp 1, 6) Schaf (v.a. Serotyp 2, 5-7) Lamm Schaf
i.d.R. nicht assoziiert mit Erkrankungen	<i>M. glucosida</i>	Isoliert vom oberen Respi- rationstrakt des Schafes
Bronchopneumonie, Konjunktivitis Panniculitis	<i>M. granulomatis</i>	Hirsch, Reh Rind
i.d.R. nicht assoziiert mit Erkrankungen	<i>M. ruminalis</i>	Isoliert aus dem Pansen von Schaf und Rind
Pneumonie, Mastitis, Septikämie Pneumonie, Enteritis, Septikämie	<i>M. varigena</i>	Rind Schwein

Mit Ausnahme von *M. haemolytica* gibt es zu den anderen *Mannheimia*-Spezies keine Prävalenzdaten in der aktuellen Literatur, so dass ihre tatsächliche Bedeutung als Infektionserreger derzeit nur schwer zu beurteilen ist. Ebenso ist nur unzureichend bekannt, inwieweit sich *Mannheimia* spp. in ihrem Virulenzgenmuster sowie ihren Pathogenesemechanismen unterscheiden. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden daher neben einer Vielzahl von *M. haemolytica*-Stämmen auch einige Isolate der neu definierten *Mannheimia* spp. auf die bei *M. haemolytica* bekannten virulenzassoziierten Gene untersucht, um eine Vorstellung von deren pathogenetischem Potential zu bekommen.

2.1.4 Virulenzassoziierte Faktoren von *Mannheimia haemolytica* und deren pathogenetische Bedeutung

M. haemolytica produziert zahlreiche virulenzassoziierte Faktoren, die dem Bakterium die Fähigkeit zur Adhäsion an die Epithelzellen des Respirationstraktes, zur Vermehrung in der Lunge und zur Zytolyse alveolärer phagozytotischer Zellen verleihen (s. Tab. 2). Tatsächlich fehlen aber neben den aktuellen epidemiologischen Daten über die Verbreitung der Pathogene ebenso aussagefähige Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung dieser Virulenzfaktoren bei *M. haemolytica*. Molekulare epidemiologische Studien, die im Rahmen des experimentellen Teils dieser Arbeit durchgeführt wurden, könnten evtl. dazu beitragen,

die Bedeutung virulenzassoziierter Faktoren im pathogenetischen Prozess der EBP besser zu verstehen und darüber hinaus ein diagnostisches Werkzeug zur Identifizierung dieser Bakterienspezies zu entwickeln.

Tab. 2: Virulenzassoziierte Faktoren von *M. haemolytica* und deren pathogenetische Bedeutung während des Infektionsprozesses

Virulenzfaktor	Biologische Wirkung	Gene	Referenz
Nicht-fimbriale Adhäsine	<ul style="list-style-type: none"> — Anheftung an Epithelzellen des Respirationstraktes (RT) → Kolonisierung des RT — Immunmodulation — SsaI: vermutlich Verursacher des Serotyp-Shifts bei der nasopharyngealen Kolonisierung 	➤ <i>adh1</i>	[191]
Fimbriale Adhäsine		➤ unbekannt	[216, 253]
Serotyp-spezifisches Antigen I (SsaI)		➤ <i>ssaI</i>	[194]
Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex	<ul style="list-style-type: none"> — entzündungsfördernd durch Aktivierung von Granulozyten zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine — direkt zytotoxisch für bovine Lungen-Endothelzellen — synergistische Potenzierung der LKT-Aktivität — Induktion einer immunvermittelten Hypersensibilität 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>lpsA</i> ➤ <i>galE</i> 	[69, 187, 244, 255, 256, 266]
Kapsel-Polysaccharid (KPS)	<ul style="list-style-type: none"> — Schutz vor dem Membranangriffskomplex des Komplementsystems (Vermittlung einer Serumresistenz) — Verstärkung der Migration zum und Adhäsion an das Alveolarepithel 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>cap</i>-Locus <u>Region 1:</u> <i>wzt, wzm, wzf, wza</i> <u>Region 2:</u> <i>orf 1-4, nmaA, nmaB</i> <u>Region 3:</u> <i>wbrA, wbrB</i> 	[192, 325]
Äußere Membranproteine ➤ PomA	<ul style="list-style-type: none"> — unspezifischer Adhäsionsfaktor — Porinaktivität — Nährstofftransport — Aktinpolymerisierung (Rearrangierung des Wirtzytoskeletts) — Immunmodulation 	➤ <i>pomA</i>	[132, 206]
Eisenakquirierungssysteme ➤ Transferrinbindende Proteine 1 und 2 (TbP1, 2)	<ul style="list-style-type: none"> — Rezeptoren für Eisen in der äußeren Membran — Eisentzug vom Wirt (positiver Wachstumseffekt) — Immunmodulation 	➤ <i>tbpA, tbpB</i>	[238]

Tab. 2 (Fortsetzung)

Virulenzfaktor	Biologische Wirkung	Gene	Referenz
➤ ExbB-ExbD-TonB-Genlocus	— Energiebereitstellung für die Translokation von Eisen über die äußere Membran	➤ <i>exbB-exbD-tonB</i>	[122]
➤ Eisenreguliertes Protein (Iron regulated protein: Irp)	— Rezeptor in der äußeren Membran, vermutlich beteiligt an Eisenakquirierung	➤ <i>irp</i>	[123]
➤ Eisen-bindendes Protein (Ferric binding protein: FbP)	— Transport von Fe ³⁺ über den periplasmatischen Spalt zum Zytoplasma	➤ <i>fbp</i>	[169]
Lipoproteine ➤ Lpp 1-5 (Plp A-E) ➤ Lpp 38	— Vermittlung einer Serumresistenz — Stabilisierung der Integrität der äußeren Membran — Immunmodulation	➤ <i>lpp 1-5 (plpA-E)</i> ➤ unbekannt	[62, 220, 227, 241, 242]
Leukotoxin	<u>hohe Toxinkonzentration:</u> — zytolytische Aktivität gegen Wiederkäuer-Leukozyten <u>sublytische Toxinkonzentration:</u> — Induktion der Zytokinproduktion und anderer Mediatoren durch bovine Leukozyten — Induktion von Zytoskelettveränderungen und Apoptose — negative Regulation von MHCII-Proteinen auf Makrophagen	➤ <i>lktCABD</i>	[70, 133, 157, 305]
Enzyme ➤ Neuraminidase ➤ Glykoprotease	— Kolonisation des Wirtgewebes — hydrolytische Freisetzung nährstoffreicher Sialinsäuren aus Wirtglykosiden (positiver Wachstumseffekt) — Immunmodulation	➤ <i>nanH</i> (putativ) ➤ <i>gcp</i>	[191] [1, 293]
➤ ImmunglobulinG1-Protease	— Hydrolyse sekretorischer Antikörper des bovines RT → Verstärkung der bakteriellen Adhäsion, Phagozytoseschutz, Reduktion der mukoziliaren Clearance	➤ unbekannt	[183]
➤ Superoxid-Dismutase (SodA, SodC)	— Schutz vor Phagozytose und Sauerstoffradikalen während des oxidativen Bursts — Herabsetzung der mukoziliaren Clearance	➤ <i>sodA / sodC</i>	[177, 278]

2.1.4.1 Adhäsionsfaktoren

Bei *M. haemolytica* stellt die nasopharyngeale Wirt-Kolonisierung die erste Phase einer erfolgreichen Infektion dar. Die Kenntnis über Faktoren, die zur Kolonisierung des Pharynx und der tonsillären Krypten durch *M. haemolytica* beitragen, ist bis heute jedoch sehr gering. Neben fimbrialen und nicht-fimbrialen Adhäsinen vermitteln v.a. auch unspezifische Adhäsionsfaktoren die Anheftung an das nasopharyngeale Epithel.

2.1.4.1.1 Fimbrien-assoziierte Adhäsine

Eine Beteiligung von Fimbrien an der Adhäsion von *M. haemolytica* an Wirtsgewebe ist aufgrund mangelnder Charakterisierung und fehlender Identifizierung der kodierenden Gene bis heute nicht eindeutig geklärt. Auf der Oberfläche von [*P.*] *haemolytica*-Zellen konnten sowohl Fimbrien als auch eine extensive anionische Glykokalyx nachgewiesen werden. Die Expression dieser beiden Strukturen erfolgte *in vitro* in der logarithmischen Wachstumsphase der Mikroorganismen und war elektronenmikroskopisch ebenso bei Isolaten experimentell infizierter Kälber visualisierbar, wo die Kapsel sogar fünffach stärker war als bei *in vitro* gewachsenen Zellen [216].

Des Weiteren hat man bei [*P.*] *haemolytica* A1-Stämmen starre Fimbrien mit einem Durchmesser von 12 nm und einem Molekulargewicht (MG) der Protein-Untereinheit von 35 kDa nachgewiesen. Diese Fimbrien konnten bei zahlreichen [*P.*] *haemolytica* A1-Isolaten aus dem ORT und aus der Lunge von Rindern phänotypisch nicht demonstriert werden, was die Vermutung nahe legt, dass deren Expression entweder eine stammspezifische Eigenschaft ist oder anderen Mechanismen, wie beispielsweise einer Phasenvariation unterliegt [120, 253].

Erst weitere Untersuchungen zur Verbreitung, Struktur, genetischen Grundlage und Expression von Fimbrien bei *M. haemolytica* könnten eine gesicherte Aussage zu deren Bedeutung für die Adhäsionsfähigkeit des Mikroorganismus ermöglichen.

2.1.4.1.2 Nicht-fimbriale Adhäsine

Die Fähigkeit zur Adhäsion von *M. haemolytica* an bovines nasopharyngeales Gewebe unter Beteiligung von Epithel-Zilienzellen und Oberflächenschleim konnte erstmals im Jahre 2001 durch die Entwicklung eines *ex vivo*-Modells demonstriert werden [54]. Das erste bei

[*P.*] *haemolytica* identifizierte und mit der Adhäsionsfähigkeit des Mikroorganismus korrelierende Adhäsine sind ein 68 kDa großes Kaninchen-Erythrozyten-spezifisches Agglutinin mit einem Sialoglykoprotein als putativem interagierendem Wirtsrezeptor [154].

Die für ein weiteres putatives Adhäsine-Molekül kodierende Genregion wurde später auf dem *M. haemolytica*-Chromosom identifiziert. Das bis dato erst unvollständig charakterisierte **Adhäsine 1** (Adh1) mit einem vermutlichen MG von 225 kDa weist eine große Ähnlichkeit zur Familie der hochmolekularen Adhäsine-Proteine fimbrienloser, nicht typisierbarer *H. influenzae*-Stämme wie Hia (*H. influenzae* adhesin) oder Hsf (*H. surface fibril*) auf. Prototyp dieser Adhäsine-Typen ist das hoch immunogene, 114 kDa große Protein Hia – eine dünne Oberflächen-Fibrille, die die Adhäsion der Bakterien an konjunktivales Epithel *in vitro* vermittelt und darüber hinaus eine protektive Immunantwort bei experimentell infizierten Chinchillas stimuliert. *M. haemolytica* Adh1 zeigt Charakteristika der zur TypV- oder Autotransporter-Familie gehörenden, in funktionellen Domänen organisierten Polyproteine. Mitglieder dieser Familie werden von Gram-negativen Bakterien autonom sezerniert und besitzen in der Regel virulenzassoziierte Funktionen, wie z.B. auch die *H. influenzae*-IgA-Protease oder das Temperatur-sensitive Hämagglutinin geflügelpathogener *E. coli* [198].

Ein drittes potentiell Adhäsine von *M. haemolytica* mit einem MG von 340 kDa weist eine große Ähnlichkeit zum putativen filamentösen Hämagglutinin von *Neisseria meningitidis* auf. Die Sequenzinformationen weisen darauf hin, dass dieses *M. haemolytica*-Adhäsine einen anderen Wirkungsmechanismus nutzt, als man es von derartigen hochmolekularen Hämagglutininen kennt, die eine Anheftung an Wirtsgewebe und –zellen meist über das Zelladhäsionsmolekül Integrin vermitteln [132].

Obwohl die *M. haemolytica*-Genomsequenz also durchaus die Präsenz verschiedener putativer Adhäsine indiziert, fehlen zur Verifizierung ihrer pathogenetischen Bedeutung eine ausführliche strukturelle Charakterisierung sowie funktionale Studien.

2.1.4.1.3 Unspezifische Adhäsionsfaktoren

Nicht alle Bakterien, die an Schleimhaut-Oberflächen adhären, besitzen spezifische Adhäsine oder Fimbrien als Kolonisationsfaktoren. Vielmehr können Mikroorganismen auch unspezifisch an epithelialen Oberflächen via Kapsel- oder Oberflächenstrukturen adhären oder innerhalb des mukösen Layers verbleiben – eine Möglichkeit, die auch für

[*P.*] *haemolytica* diskutiert wurde. In verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Studien konnte bestätigt werden, dass Kapsel-Polysaccharide, LPS, OMPs, eine Neuraminidase und Serotyp-spezifische agglutinierende Antigene in Abwesenheit von Fimbrien bei einer *M. haemolytica*-Infektion die Adhärenz des Mikroorganismus an bovine epitheliale Oberflächen vermitteln [58, 316, 325].

Das Serotyp-spezifische Antigen SsaI von [*P.*] *haemolytica* A1 scheint eine wesentliche Rolle bei der Kolonisierung des Nasopharynx zu spielen, da diese durch die Zugabe von Anti-SsaI-Antikörpern unterbunden werden kann. Die Motife des durch das Gen *ssaI* kodierten Proteins lassen vermuten, dass SsaI eine Protease-Aktivität besitzt. Eine DNS-DNS-Hybridisierung mit der *ssaI*-Sequenz des Serotyps A1 als Sonde erbrachte ein positives Signal bei den Serotypen A2, 5, 6, 7, 9 und 12, die *in vitro*-Expression des Antigens gelang jedoch bisher nur bei Serotyp A1-Stämmen [119-121, 194]. Welche Rolle SsaI *in vivo* allerdings tatsächlich für die Kolonisierung von *M. haemolytica* spielt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Man vermutet, dass es für die Verdrängung der nicht-Serotyp 1-Stämme vom Epithel des ORT („Serotyp-Shift“) verantwortlich ist [120].

2.1.4.2 Kapsel-Polysaccharid (KPS)

Die auf der Zelloberfläche einer Vielzahl bakterieller Spezies vorhandenen Polysaccharid-Kapseln sind häufig mit der Pathogenität und Immunität dieser Erreger assoziiert. Sie können beteiligt sein an der Tenazität des Mikroorganismus in der Umwelt, der Adhäsion an epitheliale Zellen, Kolonisation und Wirtsinvasion und haben einen Einfluss auf die Phagozytose- und Serumresistenz [274].

Bei [*P.*] *haemolytica* bilden die Kapsel-Antigene die Grundlage des Serotypisierungsschemas [18]. Ein hoher Grad an intraspezifischer Variabilität in der Struktur des Kapselmaterials lässt vermuten, dass die Kapseln zur Wirtsspezifität und zu Unterschieden in der Virulenz einzelner Stämme beitragen [103]. Die Kapsel des v.a. an Schafe adaptierten Serotyps A2 besteht aus den Neuraminsäure-Derivaten Colomin- bzw. Sialinsäure, die man auch bei Kapseln von *N. meningitidis* Gruppe B- bzw. *E. coli* K1-Stämmen findet. Derartige Kapsel-Strukturen sind bekannt als extrem schwache Immunogene, wobei die vermeintliche Immuntoleranz zurückgeht auf eine gemeinsame Antigenität mit den Sialinsäure-Strukturen, die Bestandteil eukaryotischer Wirtsmembranen sind. Übereinstimmend mit dieser Hypothese hat

sich [*P.*] *haemolytica* A2 als bisher am schwächsten immunogen unter allen Serotypen erwiesen [89, 201].

Die genetische Organisation des [*P.*] *haemolytica* A1-KPS-Biosynthese-Clusters gleicht der von sogenannten Gruppe II Kapsel-Gen-Clustern, die zwei hoch konservierte Domänen für Transport (Region 1) und Modifikation (Region 3) und eine Serotyp-spezifische Domäne für die Biosynthese des Kapselmaterials (Region 2) aufweisen. Prototypen sind entsprechende Loci von *H. influenzae*, *N. meningitidis* und *E. coli* K1 [192, 274].

Analog dazu findet man in der Region 1 des 16 kb großen Sequenzabschnittes auf dem [*P.*] *haemolytica*-Genom vier Gene (*wzt*, *wzm*, *wzf*, *wza*), die für einen ABC-Transporter kodieren, der die Sekretion des Kapsel-Materials über die Membranen vermittelt. Die zweite Region enthält sechs Gene, von denen vier (*orf1*, *orf2*, *orf3* und *orf4*) keine Ähnlichkeiten zu bekannten Strukturen aufweisen, während die übrigen zwei (*nmaA*, *nmaB*) für Homologe der maßgeblich an der Synthese des Kapselmaterials beteiligten Enzyme UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase und UDP-N-Acetylmannosamin-Dehydrogenase kodieren. Die Region 3 des *M. haemolytica* Kapsel-Locus enthält zwei Gene (*wbrA*, *wbrB*), die an der Phospholipid-Modifikation des Kapsel-Materials beteiligt sind [192].

Natürlich vorkommende kapsellose Varianten von [*P.*] *haemolytica* sind selten beschrieben und ihre genetische Grundlage bisher nicht untersucht worden. Eine kapsellose *nmaA* / *nmaB* knockout-Mutante erwies sich als ebenso resistent wie der Wildtyp-Stamm gegenüber einer Komplement-vermittelten Abtötung in Seren von Kälbern, die kein Kolostrum erhalten haben, war jedoch sensibler gegenüber diesem Effekt in immunem bovinem Serum. Die Autoren vermuteten, dass lange O-Polysaccharidketten, die man bei beiden Stamm-Varianten fand, für die Vermittlung der Serumresistenz verantwortlich waren [212].

Die protektiven Eigenschaften des [*P.*] *haemolytica*-KPS gegen die Pasteurellose bei Rindern sind laut Literaturangaben beschränkt und ein Schutz besteht, wenn überhaupt nach einem homologen Challenge [61, 329, 332]. Auch eine Subunit-Vakzine aus Kapselmaterial von [*P.*] *haemolytica* A1 erzeugte bei Ziegen gegen einen homologen Challenge nur partiellen Schutz [264]. Man vermutet, dass die antigenetischen Eigenschaften der KPS durch Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden und, dass nur *in vivo* produziertes KPS eine protektive Immunantwort hervorrufen kann [115].

2.1.4.3 Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex

Der LPS-Komplex von [*P.*] *haemolytica* ähnelt in seiner noch nicht vollständig aufgeschlüsselten Struktur dem anderer Gram-negativer Bakterien, bestehend aus der Lipid A-Schicht als Teil der äußeren Membran, Kern-Oligosacchariden und äußeren immunogenen Polysaccharid-Ketten [129].

[*P.*] *haemolytica*-Stämme unterschiedlicher Serotypen weisen ein hohes Maß an Variabilität innerhalb ihrer LPS-Struktur auf. Die Tatsache, dass bestimmte LPS-Typen in bestimmten Isolaten auftauchen, gab Anlass zur Spekulation, dass eine Korrelation zwischen LPS-Typ und Wirtsspezifität existieren könnte [103]. So gibt es Hinweise darauf, dass zumindest bei Schafen der *M. haemolytica*-LPS-Typ Inzidenz und Schweregrad einer EBP beeinflusst und darüberhinaus zur Wirtsspezifität des Isolates beitragen kann [136]. Die genetische Grundlage für die *M. haemolytica* LPS-Variabilität ist unseres Wissens noch nicht untersucht worden.

Bisher wurden zwei potentiell in die LPS-Biosynthese involvierte Gene bei [*P.*] *haemolytica* kloniert und charakterisiert. Potter und Lo beschrieben 1995 einen offenen Leserahmen von 263 Aminosäuren (AS) mit signifikanter Ähnlichkeit zu dem Lipooligosaccharid (LOS)-Biosynthese-Gen *lic2A* von *H. influenzae* Typ b. Im Unterschied zu *lic2A* fehlt dem [*P.*] *haemolytica* A1-Gen *lpsA* ein charakteristisches Sequenz-Motif (CAAT-Motif), das bei *H. influenzae* in die Phasenvariation des LOS involviert ist – ein Phänomen, das dem Mikroorganismus ein Entgehen der Immunabwehr erlaubt und ihm so einen Selektionsvorteil verschafft. Das 792 bp große Gen *lpsA* kodiert für eine potentielle Glykosyltransferase (LpsA) mit einem MG von 30,9 kDa, die an der Biosynthese der Kern-Oligosaccharide beteiligt ist. PCR-Analysen und DNS-DNS-Hybridisierungen haben gezeigt, dass dieses Gen bei allen Biotyp A-Stämmen, jedoch bei keinem der getesteten Biotyp T-Isolate vorhanden ist [255]. Ein zweites Gen, das bei der LPS-Synthese eine Rolle spielt, ist *galE*, das für eine UDP-Galaktose-4-Epimerase (GalE) kodiert, die an der Konversion von UDP-Glukose in UDP-Galaktose, einem Haupt-Precursor-Molekül in der LPS- und Kapsel-Biosynthese von *M. haemolytica*, beteiligt ist. Bei den darmpathogenen Spezies *E. coli* und *S. Typhimurium* ist *galE* Bestandteil des klassischen Galaktose-Operons, bestehend aus den Genen für die Epimerase (*galE*), Transferase (*galT*) und Kinase (*galK*). Diese operonale Struktur trifft für *M. haemolytica* A1 nicht zu. Vielmehr ist hier *galE* von DNS-Sequenzen flankiert, die auf eine Separation des Gens vom Galaktose-Operon während der Evolution hindeuten. Das

37 kDa grosse GalE-Protein gilt bei einer Vielzahl anderer pathogener Gattungen, wie z.B. *Escherichia*, *Salmonella*, *Pasteurella* und *Haemophilus* als wichtiger Virulenzfaktor, da es bei diesen sowohl bei der Synthese des LPS als auch der Kapsel beteiligt ist [104, 256].

[*P.*] *haemolytica*-LPS spielt im Infektionsprozess eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der massiven inflammatorischen Reaktionen in der Lunge von Rindern und Schafen. Im Rahmen experimenteller Studien bewirkte bronchioskopisch in Kälberlungen appliziertes Endotoxin sowie die intratracheale Gabe von [*P.*] *haemolytica*-LPS an Lämmer innerhalb weniger Stunden die Entwicklung einer akuten fibrinopurulenten Pneumonie, begleitet von einer Schwellung der Alveolar- und Kapillar-Endothelien, Ödemen, Haemorrhagien und massivem Austreten neutrophiler Granulozyten in das Interstitium und die kleinen Luftspalten der Lungen. Isolierte neutrophile Granulozyten zeigten charakteristische Merkmale einer Nekrose [69, 294, 324].

Seine Wirkung entfaltet das LPS allgemein über die Bindung an das LPS-Bindungsprotein LBP. Nach der experimentellen Infektion von Rindern mit *M. haemolytica* fand man einen signifikanten Anstieg des als diagnostischen Marker vorgeschlagenen LBP im Plasma. Der entstandene LPS-Protein-Komplex, der spezifisch an Rezeptoren (CD14) verschiedener Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen bindet, bewirkt die Freisetzung zahlreicher Zytokin-Mediatoren aus den aktivierten Zellen, wodurch die entsprechenden biologischen Prozesse initiiert werden [265, 291]. Die durch das [*P.*] *haemolytica*-LPS initiierte inflammatorische Kaskade wird in erster Linie über die Induktion von Interleukin (IL)-1 beta und IL-8 via Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-alpha entfaltet [176, 334]. LPS-exponierte Lungen-Parenchymzellen reagieren zudem mit einer spontanen Freisetzung von Histamin, Leukotrien B4 und Prostaglandin E2 [286]. Neben den beschriebenen Effekten bildet das *M. haemolytica*-LPS hochmolekulare Aggregate mit dem Leuktotoxin (LKT) (s. Kap.2.1.4.7), liefert diesem eine thermische Stabilität und scheint eine Steigerung der biologischen Aktivität des Toxins gegen bovine Lymphozytenzellen bewirken zu können [187]. Eine ähnlich synergistische Potenzierung einer Toxinaktivität durch Endotoxin wurde für das dem LKT strukturell verwandte *E. coli* alpha-Hämolysin beschrieben [316].

2.1.4.4 Äußere Membranproteine

Neben ihrer Bedeutung für die strukturelle Integrität der bakteriellen Membran Gram-negativer Bakterien besitzen die sowohl integral als auch peripher in die äußere Membran eingelagerten äußeren Membranproteine (OMPs = **O**uter **m**embrane **p**roteins) häufig die Fähigkeit zur Adhäsion an Wirtsstrukturen und haben darüber hinaus eine immunmodulatorische Wirkung auf das Wirtsabwehrsystem, weshalb sie häufig als erfolgversprechende Impftargets angesehen werden [289].

Auch bei *M. haemolytica* gelten OMPs als wichtige Immunogene, obwohl verschiedene Studien belegen, dass die Vakzinierung von Lämmern und Kälbern mit [*P.*] *haemolytica*-OMP-Präparationen zwar in einer hohen Antikörperbildung resultiert, diese jedoch keine gute Protektion nach sich zieht. Darüber hinaus erweist sich meist nur ein effektiver Schutz gegen einen homologen, nicht aber gegen einen heterologen Challenge. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass beispielsweise [*P.*] *haemolytica*-Isolate der Serotypen A1, A2 und A6 von Rind und Schaf konsistente Unterschiede in den OMP-Profilen aufweisen, die außerdem darauf hindeuten, dass bestimmte OMPs an der Wirtsspezifität und Virulenz von [*P.*] *haemolytica* beteiligt sind [73].

Neben ihrer potentiellen Bedeutung als Impftargets vermitteln *M. haemolytica*-OMPs zahlreiche biologische Effekte, die im folgenden für das 38 kDa OmpA-ähnliche Protein PomA, eisenregulierte OMPs (IROMPs), sowie verschiedene Lipoproteine, die eine größere Beachtung in der Forschung gefunden haben, detaillierter besprochen werden.

2.1.4.4.1 PomA

Ein Hauptprotein der äußeren Membran von [*P.*] *haemolytica* ist das 38 kDa große, hitze-modifizierbare PomA (*P*asteurella **o**uter **m**embrane protein). Das Protein hat in seiner N-terminalen Sequenz eine signifikante Ähnlichkeit zum *E. coli* OmpA-Protein, das den Prototyp der Familie der OmpA-Proteine darstellt und für die Aufrechterhaltung der Integrität der äußeren Membran sorgt sowie eine starke Antikörper-Reaktion stimuliert. Neben ihrer stabilisierenden Funktion können OmpA-Proteine auch als Rezeptoren für Bakteriophagen dienen oder die Resistenz gegenüber einer Komplement-vermittelten Lyse durch die Bindung von Antikörpern bestimmen. OmpA-Superfamilie-Mitglieder haben zudem eine Porin-Aktivität, die auch PomA mit der Bildung kleiner Ionen-permeabler Kanäle im Lipid-Bilayer aufweist. Nach der Klonierung des 1.136 bp großen *M. haemolytica pomA*-Gens gelang es nicht, das

Gen durch molekularbiologische Techniken zu inaktivieren, was den Schluss nahe legt, dass PomA für den Nährstofftransport bzw. die Stabilität der äußeren Membran essentiell ist [206].

2.1.4.5 Eisenregulierte äußere Membranproteine

Eisen stellt für nahezu alle Mikroorganismen einen bedeutenden Wachstumsfaktor dar. Eine kontinuierliche Zufuhr dieses an zahlreichen metabolischen Prozessen beteiligten Cofaktors ist daher für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines Mikroorganismus in seiner Umgebung und letztendlich für die Ausprägung seines pathogenetischen Potentials essentiell. Der für das mikrobielle Wachstum benötigten Menge von 10^{-6} mol/l Eisen steht eine Konzentration frei verfügbaren Eisens von 10^{-9} mol/l in den Körperflüssigkeiten des Säugetier-Wirtes gegenüber. Hinzu kommt, dass das meiste Eisen entweder intrazellulär in Form von Ferritin oder Hämin-Bestandteilen bzw. extrazellulär komplexiert an Wirts-Glykoproteine, wie Transferrinen vorliegt. Der bis heute am besten untersuchte Mechanismus der Eisenaufnahme bei Mikroorganismen ist die Synthese und Sekretion von Siderophoren (griech.: Eisenträger), eine zweite Strategie ist die Expression von Rezeptorproteinen auf der Oberfläche der äußeren Membran, mit denen Eisen-Komplexe des Wirtes, wie Transferrin oder Hämoglobin direkt gebunden werden. Beide genannten Systeme involvieren neben den Schlüsselementen Siderophore bzw. Transferrin-bindende Proteine zusätzliche Eisen-regulierte äußere bzw. periplasmatische Membranproteine, die den Transport des freigesetzten Eisens durch das Periplasma und nachfolgenden Transfer zum Zytoplasma ermöglichen, sowie die dazu benötigte Energie bereitstellen [268].

[*P.*] *haemolytica* A1 produziert verschiedene Eisen-regulierte äußere Membranproteine (IROMPs: iron regulated outer membrane proteins), darunter ein 77 kDa- Protein unbekannter Funktion sowie die Transferrin-bindenden Proteine TbP1 (100 kDa) und TbP2 (71 kDa). Da man bei [*P.*] *haemolytica* keine Produktion klassischer Siderophore-Typen feststellen konnte, wurden die TbPs als Schlüssel in der Eisenakquirierung dieser Spezies angesehen. Die *in vivo* nachgewiesene vermehrte Expression von IROMPs unterstreicht ihre wesentliche Rolle in der Eisenakquirierung während des Infektionsprozesses [76, 83, 236, 238].

Transferrine sind bilobäre (C- und N-Lobe), ca. 80 kDa große, monomere Glykoproteine, die zwei Fe^{3+} -Ionen pro Molekül mit hoher Affinität binden können. Man findet sie

hauptsächlich im Serum von Säugetieren und in signifikanter Menge (3 % des Gesamtproteins) auch in der Broncho-Alveolar-Flüssigkeit. Transferrine stellen daher speziell für lungentypische Infektionserreger eine potentielle Eisenquelle dar [59, 110]. Anders als bei TbPs von Säugetieren, die ein weites Spektrum an eukaryotischen Transferrin-Proteinen binden können, zeigen TbPs von Vertretern der Familie *Pasteurellaceae* eine außerordentliche Wirtstranferrin-Spezifität. Rezeptoren des ausschließlich Rinder-pathogenen Erregers *H. somnus* weisen beispielsweise eine strikte Spezifität für bovines Transferrin auf und sind im Gegensatz zu [*P.*] *haemolytica* nicht in der Lage, Transferrine der verwandten ruminalen Spezies Schaf und Ziege zu binden. Die breitere Spezifität von [*P.*] *haemolytica* ist offenbar nicht in der Expression unterschiedlicher TbPs begründet, sondern geht vielmehr auf eine variierende Transferrin-Rezeptor-Interaktion zwischen den verschiedenen Molekülanteilen der bilobären ruminalen Transferrine zurück. Diese unterschiedliche Form der Interaktion könnte sich in der Wirtsspezifität der untersuchten Mikroorganismen widerspiegeln und würde z.T. auch die niedrige Virulenz von [*P.*] *haemolytica* für Labortiere erklären [236, 335, 336].

TbP1 ist ein integrales, TonB-abhängiges Membranprotein, das als Durchgangspore in der äußeren Membran agiert, während das TbP2 als Lipoprotein vermutlich nur peripher mit der äußeren Membran assoziiert ist. Eine Interaktion von Transferrin mit dem TbP1/2-Komplex zusammen mit einer Energietransduktion via TonB-Protein induziert eine Konformationsänderung am Transferrinmolekül und führt zu einer Freisetzung von Fe^{3+} . Es folgt ein TbP1-vermittelter Transfer des Eisens über die äußere Membran und die Weiterleitung des Ions an das Eisen-bindende Protein FbP (**F**erric **b**inding **p**rotein), das Fe^{3+} über den periplasmatischen Spalt zu einem Permease-Komplex der inneren Membran transportiert, durch den das Eisen dann letztendlich in das Zytoplasma transloziert wird [64, 170].

Die [*P.*] *haemolytica* A1 TbP1- und TbP2-kodierenden Gene *tbpB* (TbP2)-*tbpA* (TbP1) liegen auf einem Operon und werden durch eine dem *tbpB* vorausgehende Promotersequenz koordiniert transkribiert. Ihre AS-Sequenzen weisen eine hohe Ähnlichkeit zu entsprechenden Proteinen von *A. pleuropneumoniae* und *H. somnus* auf. Auch das 35 kDa große Eisen-bindende Protein FbpA konnte bei [*P.*] *haemolytica* nachgewiesen werden. Es fungiert als periplasmatischer Shuttle in der Rezeptor-vermittelten Eisen-Aufnahme und weist auf AS-Ebene eine hohe Ähnlichkeit zu dem 37 kDa großen FbP verschiedener *Neisseria*-Spezies auf. Weitere Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass dem *tbpB-tbpA*-Operon ein Motif für die Bindung eines Eisen-regulierenden Proteins vorausgeht und sogar dessen mutmaßlichen Promoter überlappt. Ein Komplex aus Eisen und dem Repressorprotein Fur (**F**erric

uptake regulation) kann, wie es z.B. bei *Actinobacillus*- bzw. *Haemophilus*-Spezies bereits verifiziert wurde, an das erwähnte Motif binden und so die Transkription blockieren [169, 238].

Der in der Zytoplasmamembran von [*P.*] *haemolytica* verankerte Protein-Komplex TonB-ExbB-ExbD, der durch den bereits bei *Haemophilus*- und *Neisseria*-Spezies identifizierten *exbB-exbD-tonB*-Locus kodiert wird, liefert die Energie für den Prozess der Rezeptor-vermittelten Eisen-Aufnahme. Da auch das TbP1 von [*P.*] *haemolytica* am N-Terminus eine typische TonB-Box aufweist, gehen die Autoren auch bei dieser Spezies von einer Interaktion des Rezeptors mit dem TonB-Protein aus [30, 122].

Die zentrale Rolle der *M. haemolytica* TbPs in der Eisenaquirierung macht sie zu attraktiven Targets für die Entwicklung einer Vakzine. In einer experimentellen Studie zur protektiven Kapazität der [*P.*] *haemolytica* TbPs1 und 2 wiesen Kälber, die mit rekombinantem TbP2 immunisiert worden waren, einen messbaren Antikörper-Titer gegen dieses Antigen auf, die bei mit nativem TbP1 immunisierten Tieren nicht nachgewiesen werden konnte. Die beste Protektion, gemessen an einer deutlich geringeren Mortalität gegenüber der Kontrollgruppe, bestand dennoch nach Immunisierung mit einer Kombination aus beiden TbPs, wobei TbP1 möglicherweise über die Induktion einer Zell-vermittelten Reaktion zur Protektion beiträgt. Vorteilhaft für einen möglichen Einsatz als Impftarget ist außerdem, dass die TbPs von [*P.*] *haemolytica* unabhängig von Serotyp und Wirtsspezifität des Stammes eine geringe Variabilität aufweisen, wie mittels immunologischer und genetischer Analysen gezeigt werden konnte [83, 237, 254].

Ergänzend konnte durch partielle Komplementierung einer *E. coli fur*-Mutante ein von den TbPs unabhängiger, TonB-abhängiger, Eisen- und Fur-regulierter Rezeptor in der äußeren Membran von *M. haemolytica* A1 identifiziert werden. Das als Irp (**I**ron-**r**egulated **p**rotein) bezeichnete, 84 kDa große Protein mit bis dato unbekanntem Liganden wird von einem Gen kodiert, das mit einer erhöhten mutationsfähigen Region einer Phasenvariation unterliegt, und auf diese Weise dem Bakterium möglicherweise eine Evasion der Wirtsabwehr bei gleichzeitiger Eisenakquirierung ermöglicht [123, 191].

M. haemolytica verfügt somit über verschiedene, antigenetisch unterschiedliche eisenbindende Proteine, die dem Bakterium alternative Möglichkeiten zur Eisenakquirierung bieten und so einen erheblichen Selektionsvorteil darstellen.

2.1.4.6 Lipoproteine

M. haemolytica produziert neben dem TbP 2 und einem an der Bildung des Transport-Apparates des *M. haemolytica*-Kapselmaterials beteiligten Lipoprotein mindestens sechs weitere **Lipoproteine** (Lpp (Plp = *Pasteurella* Lipoprotein) 1-5 und Lpp38) mit MGs von 19 bis 45 kDa. Lpp 1-3 sind das Produkt von drei Tandem-Genen, die von einem Promoter transkribiert werden. Die AS-Sequenzen der ca. 30 kDa großen Lpp1-3 sind einem 28 kDa-Lipoprotein der inneren Membran von *E. coli* und einem 28 kDa Lipoprotein von *H. influenzae* Typ b ähnlich. Antikörper gegen rekombinantes Lpp3 reduzieren die Empfänglichkeit von Rindern gegenüber einem experimentellen Challenge mit [*P.*] *haemolytica*. Entsprechend war eine Lpp1-3-defiziente Mutante sensibler gegenüber einer Antikörper-abhängigen, Komplement-vermittelten Lyse und zeigte ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich langsames Wachstum in einem Medium mit 50 % fötalem Kälberserum. Da die Vitalität in nicht supplementiertem Medium unbeeinflusst blieb, schlossen die Autoren aus dem Wachstumsverhalten im Serum auf eine geringere Überlebensfähigkeit der Mutante *in vivo*. Dies könnte erklären, warum die Lpp-defiziente Mutante nach intraperitonealer Infektion von Mäusen eine im Vergleich zum Wildtyp um 40 % höhere LD₅₀ aufwies [58, 72, 222]. Als Ursache der erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Komplement-Membran-Angriffskomplex vermuteten verschiedene Autoren eine Modifizierung der Membran im Sinne eines Remodelings, das eine erhöhte Fragilität der Zellhülle bedingen könnte. Eine modifizierte Membran, die Eisen nur reduziert aufnehmen kann, könnte auch die beobachtete erhöhte Expression von Eisen-regulierten äußeren Membranproteinen der Mutante erklären [58, 132].

Ein viertes, 31 kDa großes Lipoprotein (PlpD) weist große Ähnlichkeiten zum 31 kDa-Antigen von *H. somnus* und zum 19,2 kDa-Antigen von *N. meningitidis* auf. Die C-terminale Hälfte des Proteins zeigt Ähnlichkeiten zu OmpA-Familie-Proteinen. Plp4 ist somit ein neuer OMP-Typ, der typische OmpA-Motife enthält, aber auch Lipid-modifiziert ist [227].

Mit dem nach seinem MG benannten Lpp38 wurde ein weiteres, z.T. oberflächenexponiertes, immunogenes Lipoprotein bei einem [*P.*] *haemolytica* A1-Stamm identifiziert. Serologisch wurde ein Protein mit ähnlichem MG bei allen 12 Biotyp A-Serotypen und einem nicht-typisierbaren Stamm detektiert [242].

Das 45 kDa große oberflächenexponierte Lipoprotein PlpE weist in seiner DNS-Sequenz eine Ähnlichkeit von 32-35 % zum Lipoprotein OmlA der schweinepathogenen Spezies *A. pleuropneumoniae* auf. Anti-PlpE-Antikörper detektieren PlpE in allen [*P.*] *haemolytica*-Serotypen bis auf Serotyp A11 (heute: *M. glucosida*). Die Bedeutung des PlpE liegt u.a. in einer signifikanten Reduktion der Komplement-vermittelten Lyse durch Antikörper [241]. Rekombinantes PlpE ist hoch immunogen und bewirkt eine erhebliche Reduzierung der Lungenschäden bei Rindern nach einem experimentellen Challenge mit *M. haemolytica*. Durch eine Zugabe von rPlpE zu der kommerziellen Vakzine Presponse® wurde die Protektion gegen einen *M. haemolytica*-Challenge und die Antikörper-Reaktion auf rPlpE verstärkt. Die Autoren vermuten, dass die Zugabe eines oder mehrerer rekombinanter Proteine zu einer *M. haemolytica*-Vakzine eine deutlich bessere Protektion von Rindern gegen die EBP gewährleisten könnte [57].

2.1.4.7 Leukotoxin

Das von *M. haemolytica* sezernierte LKT ist ein ca. 105 kDa großes, calciumabhängiges Protein, das als primärer Virulenzfaktor in der Pathogenese der EBP beim Rind angesehen wird. In seiner engen Wirtsspezifität wirkt es toxisch auf Wiederkäuer-Leukozyten, nicht aber auf die anderer Haus- oder Versuchstiere bzw. humane Leukozyten. [*P.*] *haemolytica* besitzt eine schwache hämolytische Aktivität gegenüber bovinen, ovinen und leprinen Erythrozyten, die auf die Wirkung des LKT zurückzuführen ist [35, 58, 221].

Das *M. haemolytica* LKT gehört zur Gruppe der RTX (repeats in toxin; X = n Glycine)-Toxine, die die größte Familie innerhalb der heterogen zusammengesetzten Gruppe der Zytolysine bilden. Alle Mitglieder der RTX-Toxin-Familie besitzen eine namensgebende konsekutive (6-45 mal), repetitive glycinreiche Sequenz von neun AS für die Bindung von Calcium. Sie umfassen sowohl Zytolysine, die gegen ein weites Spektrum von Zelltypen einer Vielzahl von Spezies aktiv sind (z.B. *E. coli* Alpha-Hämolysin und ApxI von *Actinobacillus*

(*A. pleuropneumoniae*) als auch zytolytische Toxine mit enger Zielzell- und Wirtsreaktivität (z.B. *M. haemolytica* Leukotoxin (LKT)) [200, 322].

Referenzstämme aller 16 Serotypen von [*P.*] *haemolytica* produzieren LKTs, die immunologisch, funktionell und genetisch sehr nah verwandt, aber nicht identisch zum LktA des Serotyps 1 sind. Der Serotyp 11 (heute: *M. glucosida*) produziert ein zusätzliches Zytotoxin mit einem MG von 120 kDa, das antigenetisch einer zur RTX-Familie gehörenden Hämolyisin-Variante von *A. pleuropneumoniae* ähnelt [37, 45, 193]. Ein dem LktA ähnliches Toxin mit einer geringeren Spezies-Spezifität und fehlendem Hämolyse-Vermögen wurde in einem [*P.*] *haemolytica*-like Bakterium, das von Schweinen mit Durchfall isoliert wurde, identifiziert, und auch bei [*P.*] *granulomatis* konnte ein Protein mit ähnlicher Struktur gefunden werden [44, 313].

Wie viele andere Vertreter aus der Gruppe der RTX-Toxine ist das *M. haemolytica*-LKT durch ein Gencluster (*lktCABC*) kodiert, das aus einem Strukturgen (*lktA*), einem Gen für die posttranslationale Acylierung (*lktC*) und somit Aktivierung des Protoxins (LktA) und den für Elemente der Sekretion kodierenden Genen *lktB* und *lktD* besteht [133, 134].

Alle RTX-Toxine werden via direkter autonomer Translokation über die innere und äußere Membran in den Extrazellularraum sezerniert. Dieser sogenannte TypI-Sekretions-Mechanismus ist abhängig von spezifischen, hoch konservierten Export-Systemen, die sich aus einer zur Superfamilie der ATP-Bindungskassette (ABC)-Transportern gehörenden ATPase in der inneren Membran, einem Membran-Fusionsprotein (MFP) und einem meist außerhalb des Genclusters kodierten äußeren Membranprotein zusammensetzen. Beim *M. haemolytica* LKT ist die ATPase durch *lktB* und das die innere und äußere Membran fusionierende Protein (MFP) durch *lktD* kodiert [200].

Obwohl das LKT an Zellen einer Vielfalt von Spezies (ruminante, equine, porcine, canine, humane Lymphozyten) binden kann, setzt die Zytolyse eine spezifische Interaktion mit dem bovinen Lymphozyten-Funktions-assoziierten Antigen 1 (LFA-1) als Rezeptor an der Targetzelle voraus. Das zur Familie der interzellulären Adhäsionsmoleküle gehörende LFA-1 ist ein heterodimeres, Leukozyten-spezifisches beta(2)-Integrin, das sich aus den Untereinheiten CD11a (α -Kette) und CD18 (β -Kette) zusammensetzt. Durch die Vermittlung der Leukozyten-Bindung an Endothelzellen via Interaktion mit unterschiedlichen Zell-Adhäsionsmolekülen, wie Selektinen, Integrinen oder Immunglobulinen, beeinflusst LFA-1

die Leukozytenmigration während der inflammatorischen Reaktion. Neuere Arbeiten belegen, dass LKT und LPS kooperativ die LFA-1-Expression erhöhen und auf diese Weise die massiven Entzündungsvorgänge in der Lunge potenzieren [4, 156, 163, 178, 185, 187, 303].

Zahlreiche *in vitro*-Studien zur Überprüfung des Wirkungsspektrums und –mechanismus des LKT haben gezeigt, dass sich der biologische Effekt des Toxins auf alle Vertreter der Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Gewebsmakrophagen und Lymphozyten) sowie auf Thrombozyten erstreckt. In einer der Studien reflektieren die Resultate den konzentrationsabhängigen Effekt des LKT auf neutrophile Granulozyten, der sich in einer Stimulierung der Zielzellen zur Freisetzung radikaler Sauerstoffprodukte bzw. proinflammatorischer Substanzen bei sublytischen Konzentrationen bis hin zu deren apoptotischem Zelltod bzw. nekrotischen Zellveränderungen durch porenbedingte Membranschäden in Folge der Exposition hoher Toxindosen darstellt [70]. Niedrige LKT-Konzentrationen stimulieren neutrophile Granulozyten und Monozyten zur Produktion von Sauerstoffradikalen, wie Wasserstoffperoxyd. Diese werden durch bovine Alveolar-Endothelzellen in Anwesenheit von Eisen in Hydroxylradikale umgewandelt, was in einem Zelltod mit Akkumulation von Ödemflüssigkeit und Fibrin resultiert [31, 267, 299]. Weiterhin kommt es zur Sekretion zahlreicher chemotaktisch und inflammatorisch wirksamer Eicosanoide, wie Leukotrien B₄ (LTB₄), bzw. metabolisch bedeutender Vorstufen (z.B. Arachidonsäure) und zur Synthese benötigter Enzyme (z.B. Phospholipasen). Die Phospholipase spielt eine bedeutende Rolle bei der Umwandlung von Arachidonsäure in LTB₄ über einen Lipxygenase-Weg. Als potentes Chemoattractant für neutrophile Granulozyten wird LTB₄ in enger Korrelation mit der Schädigung und Lyse der Alveolarmembranen gesehen [53, 68, 317].

Bei peripheren Blutmonozyten führen sublytische LKT-Mengen zu einer G-Proteingekoppelten Erhöhung von intrazellulärem Calcium, einer Aktivierung der Phospholipasen A₂ und C und der Freisetzung von Arachidonsäure mit der Folge einer erhöhten Expression der Monokine IL-1B und TNF- α . Auch die Freisetzung des vasoaktiven Mediators Histamin durch pulmonale Mastzellen als Reaktion auf leukotoxischen Kulturüberstand von [*P.*] *haemolytica* konnte nachgewiesen werden [140, 333].

Sublytische Toxinkonzentrationen bewirken bei bovinen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten des weiteren Zytoskelett-Veränderungen bis hin zur Apoptose [300, 303-305]. [13] wiesen in einer Untersuchung eine Umwandlung monomeren G-Aktins zu polymerisiertem F-Aktin bei LKT-exponierten bovinen Leukozyten nach und schrieben diesem Effekt eine entscheidende Rolle bei der Degranulation neutrophiler Granulozyten zu. Eine durch den

Effekt des LKT bedingte Hemmung der Mitose und somit der Blastogenese Mitogen-stimulierter boviner Lymphozyten hemmt zudem die sekundäre Immunabwehr des Wirtes in erheblichem Maße [207].

Thrombozyten reagieren auf die Exposition sublytischer LKT-Mengen mit einer verstärkten Adhäsionsbereitschaft. In der Tat findet man bei der EBP als vorherrschendes histologisches Bild neben Fibrin-Ablagerungen Aggregationen von Blutplättchen in den Lungenalveolen der mit [*P.*] *haemolytica* infizierten Tiere. Diese Veränderung geht auch zurück auf eine spontane Aktivitätssteigerung des Blutplättchen-Aggregations-Agonisten Adenosindiphosphat und des Blutplättchen-Aktivierungsfaktors PAF (**p**latelet **a**ctivating **f**actor) [46, 233].

Verschiedene *in vivo*-Studien mit LKT-Mutanten sollten die pathogenetische Bedeutung des Toxins näher beleuchten. So bewirkte eine genetisch nicht charakterisierte, durch chemische Mutagenese hergestellte LKT-negative Mutante nach intratrachealer Inokulation bei Kälbern eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Mortalität und kleinere Lungenläsionen. Den gleichen Effekt erzielten andere Autoren nach endobronchialer Applikation von *lktA*-Deletionsmutanten in Kälberlungen und schlussfolgerten daraus, dass diese Mutante in ihrer Virulenz erheblich reduziert war [248, 307]. Eine *lktC*-negative, inaktives LKT sezernierende Mutante, wurde mit dem Ziel entwickelt, sie als attenuierte Lebendvakzine einzusetzen, da sie im Gegensatz zu den vorausgehenden *lkt*-Mutanten alle protektiven Epitope exprimieren sollte. Bei der transthorakalen Verabreichung entsprechender Bakterien war die LD₅₀ bei der Mutante jedoch nur um das dreifache im Vergleich zum Wildtyp-Stamm erhöht. Die Deletionsmutante war außerdem nach wie vor in der Lage – wenn auch in geringerem Maße – Lungenschäden hervorzurufen und zeigte sich in der Kolonisierung des ORT als potent. Die erwartete signifikante Attenuierung des Mikroorganismus blieb also aus, woraus die Autoren schlossen, dass neben dem LKT noch zusätzliche Faktoren in der Pathogenese der EBP beim Rind eine entscheidende Rolle spielen müssen [135].

In einer Studie zur molekularen Evolution von *lktA*-Genen boviner und oviner Isolate von *M. haemolytica*, *M. glucosida* und *P. trehalosi* wurde die DNS-Sequenzvariation von 31 *lktA*-Genen untersucht, um eine mögliche Assoziation zu Virulenzunterschieden und Wirtsspezialisierung der verschiedenen Isolate aufzuzeigen. Nach dem dort postulierten Evolutionsmodell setzt sich das „Ursprungsallel“ aller bekannten LKTs aus Abschnitten des

M. glucosida-lktA4- und des *P. trehalosi-lktA5*-Allels zusammen. Ein derartiger genetischer Austausch wäre insofern überraschend, als die genannten Spezies verschiedene Nischen bewohnen und unterschiedliche Erkrankungen hervorrufen (s. Tab. 1). Zudem verfügen beide Spezies über eine nur geringe leukotoxische Aktivität, was zu der Annahme führte, dass das LKT bei ihnen im Vergleich zu *M. haemolytica* eine geringere Bedeutung hat. Insgesamt zeigte sich, dass bovine Isolate über eine konservierte LKT-Sequenz verfügten, während ovine Stämme ein deutlich höheres Maß an Diversität zeigten. Da das LKT ein entscheidender Virulenzfaktor bei *M. haemolytica* ist und an der Wirtsimmunität beteiligt ist, ist es wahrscheinlich, dass die Rekombination des *lktA* zu einer mosaikartigen Struktur einen adaptiven Vorteil gegenüber der Antikörper-Reaktion des Wirtes durch die Generierung von antigenetischen Variationen liefert [77, 285]. Offen bleibt dann aber die Frage, warum dies nicht auch für bovine Stämme zutrifft.

2.1.4.8 Neuraminidase (Sialidase)

Neuraminidasen bzw. Sialidasen sind Enzyme, die Sialinsäure aus Verbindungen mit Glykoproteinen, Glykolipiden und Colominsäuren durch Spaltung von alpha-ketosidischen Verknüpfungen freisetzen und zur Virulenz pathogener Mikroorganismen beitragen können, insbesondere von Schleimhautbesiedlern. Als Sialinsäuren bezeichnet man sämtliche Derivate der Neuraminsäure, einem negativ geladenen Aminozucker mit einem Rückgrat aus neun Kohlenstoffatomen. Sie kommen v.a. bei höheren Tieren und dem Menschen vor, nicht aber bei Pflanzen, niederen Tieren sowie selten bei Mikroorganismen. Bei Prokaryonten erstreckt sich die Produktion der in Oberflächenstrukturen, wie Kapsel und LPS vorkommenden Sialinsäuren zumeist auf pathogene Arten, wie *E. coli*, *Salmonella*-Serovare oder [*P.*] *haemolytica*. Eukaryotische Sialinsäuren findet man v.a. gebunden an Glykokonjugate in der äußeren Membran von Zellen, aber auch als wichtige Bestandteile des Serums. Die Zusammensetzung der genannten Substrate unterliegt auch tierartlichen Variationen. So sind z. B. 22 % des Trockengewichts von bovinem submaxillaren Muzin Sialinsäuren, während es beim Schwein nur 1 % sind [42, 214, 234].

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Neuraminidasen neben einer nutritiven Funktion und einem damit einhergehenden deutlichen Wachstumsvorteil auch für die Wirtskolonisierung oder –invasion wichtige Rezeptoren demaskieren können. Durch die Enzymwirkung könnte es außerdem infolge einer Herabsetzung der Viskosität des Muzins oder einer

Veränderung der Funktionen von Immun- und Entzündungsmediatoren sowie -zellen zu einer für den Mikroorganismus vorteilhaften Interferenz mit dem Wirtsabwehrsystem kommen [33, 58, 189, 219, 302].

Eine Neuraminidase-Aktivität konnte nicht nur bei [*P.*] *haemolytica* sondern auch bei anderen Vertretern aus der Familie der *Pasteurellaceae*, wie z.B. *P. multocida*, *P. volantium*, *P. testudinis* oder dem schweinepathogenen *H. parasuis* nachgewiesen werden [189, 219, 302]. Bei 15 Serotypen von [*P.*] *haemolytica* konnten Neuraminidasen mit einem MG von 150 (Serotypen 1, 6, 10, 12 und 15) bzw. 200 kDa (Serotypen 2-5, 7-9, 13, 14 und 16) nachgewiesen werden. Beide Neuraminidasen zeigten eine vergleichbare Substratspezifität mit der größten enzymatischen Aktivität gegenüber N-Acetylneuramin-Laktose und der geringsten Hydrolyserate bei bovinem submaxillarem Muzin als Substrat. Die Autoren fanden eine 15-66 %-ige Neutralisierung der Enzymaktivitäten bei allen 15 Serotypen durch Anti-[*P.*] *haemolytica* A1-Serum und führten dies auf die Präsenz ähnlicher antigenetischer Determinanten zurück. Eine serologische Verwandtschaft zur *P. multocida*-Neuraminidase besteht nicht. [*P.*] *haemolytica* Serotyp 11 (heute: *M. glucosida*) zeigt keine Neuraminidaseaktivität, während *P. trehalosi*-Isolate (frühere Biotyp T-Stämme) eine Neuraminidase mit deutlich geringerer Aktivität als Biotyp A-Stämme produzieren [301, 323].

Das *M. haemolytica*-Genom enthält einen unvollständigen Leserahmen von 550 Codons mit einer großen Ähnlichkeit (52 % Identität) zu dem 832 Codons enthaltenden Leserahmen des *P. multocida* Neuraminidase-Gens *nanH*. Das entsprechende Produkt NanH ist eines der am Sialinsäure-Katabolismus beteiligten Polypeptide und spaltet terminale Sialinsäuren einer großen Bandbreite von Polysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden auf Zelloberflächen oder in Körperflüssigkeiten ab [132, 315].

2.1.4.9 Sialoglycoprotease

Alle Serotypen von [*P.*] *haemolytica* produzieren in der logarithmischen Wachstumsphase eine neutrale Sialoglycoprotease (Gcp) – eine Endopeptidase mit limitierter Zielzell-Spezifität, die nur Proteine hydrolysiert, die O-verknüpfte Glycoside enthalten [2, 3].

Das Gen *gcp* und das exprimierte Protein sind bei Pro- und Eukaryonten weit verbreitet, wurden aber bisher nur bei [*P.*] *haemolytica* als Virulenzfaktor bei der EBP von Rind und Schaf diskutiert. Es wird vermutet, dass diese Protease analog zur Neuraminidase an der Oberfläche

der Wirtszelle aktiv wird, um die Wirtsimmunabwehr zu unterlaufen und die Adhäsion des Mikroorganismus zu verstärken. Gcp bewirkt *in vitro* in Gegenwart von Calcium eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Blutplättchen-Adhäsion und -Aggregation – ein Phänomen, das durch Coinkubation mit Lkt potenziert wird. Experimentell resultierte das typische Bild der Pasteurellose beim Rind mit Ablagerung von aggregierten Blutplättchen und Fibrin in den Lungenalveolen als Konsequenz der Aktivität von Gcp und Leukotoxin [233].

Die 1.315 bp lange DNS-Sequenz des für die 35,2 kDa große Zink-Metalloprotease kodierenden Gens *gcp* weist keine signifikante Ähnlichkeit zu Genen anderer Proteasen pro- oder eukaryotischen Ursprungs auf, hat aber erhebliche Ähnlichkeit zum *orfX* von *E. coli*, dessen Produkt an der Regulation der Biosynthese von Makromolekülen beteiligt sein soll. Bei allen [*P.*] *haemolytica*-Serotypen des Biotyps A mit Ausnahme des Serotyps 11, d.h. bei allen nach heutiger Nomenklatur als *M. haemolytica* bezeichneten Isolaten, konnten das *gcp*-Gen und die proteolytische Aktivität der Gcp nachgewiesen werden. Die Biotyp T-Stämme (heute *P. trehalosi*) haben dagegen weder das die Gcp kodierende Gen noch die entsprechende enzymatische Aktivität der Protease. Auch der heute als *M. glucosida* bezeichnete Serotyp 11 von [*P.*] *haemolytica* ist negativ im Aktivitätstest und weist eine differierende genetische Organisation des detektierten *gcp* auf [1, 2, 184].

Mittels Western Blot konnten [*P.*] *haemolytica* Gcp-Homologe bei zahlreichen Gramnegativen Bakterien inklusive *E. coli* detektiert werden. Die Sekretion der Gcp mit entsprechender Endopeptidase-Aktivität scheint aber auf [*P.*] *haemolytica* beschränkt zu sein, während die Protease bei anderen Bakterien zytosolisch vorliegt [320].

Impfversuche und Challengeexperimente mit rekombinant hergestellter Glykoprotease an Kälbern verifizierten das Potential dieses Antigens als protektives Immunogen. In der entsprechenden Studie wird das entsprechende Fusionsprotein rGcp-F als Bestandteil einer Vielkomponentenvakzine bzw. als Zusatz zu der kommerziellen Vakzine Presponse® empfohlen [293].

2.1.4.10 Immunglobulin G-Protease

Zahlreiche bakterielle Erreger respiratorischer Erkrankungen, wie *H. influenzae*, *A. pleuropneumoniae* und *Streptococcus pneumoniae* sezernieren Proteasen, die sekretorische Antikörper spalten [208, 229]. Diese Proteasen sind Serin-Endopeptidasen, die monomeres Immunglobulin A (IgA) in Fab- und Fc-Fragmente spalten und so möglicherweise die bakte-

rielle Kolonisierung durch Eliminierung lokaler, Adhärenz-blockierender Antikörper verstärken. Fab-Fragmente behalten dabei zwar ihre volle Antigen-bindende Kapazität, können aber in diesem monovalenten Zustand keine Agglutination induzieren und sind daher unfähig, eine bakterielle Adhäsion zu verhindern. Darüber hinaus schützen alle an Oberflächen-Epitope gebundene Fab-Fragmente das Bakterium vor dem Immunsystem durch Blockierung des Zugangs von Antikörper-Molekülen des gleichen oder anderer Isotypen und von immunkompetenten Zellen [166].

Bei [*P.* *haemolytica*] konnte in einer Studie, die ursprünglich zur Überprüfung der Glykoprotease-Aktivität durchgeführt wurde, zwar keine IgA-Protease-Aktivität nachgewiesen werden, aber man fand in partiell aufgereinigten Kulturüberständen ohne leukotoxische Aktivität eine IgG-spezifische Protease, die jedoch keine Spaltung von IgA und IgM bewirkte [183]. IgG1 ist im unteren bovinen Respirationstrakt das dominierende sekretorische Immunglobulin, äquivalent dem IgA im ORT. Sowohl IgG1 als auch IgG2 nehmen wichtige Funktionen in der Abwehr der EBP ein. Die Spaltung von IgG1 verhindert vermutlich eine Fc-vermittelte Opsonierung durch Alveolarmakrophagen und reduziert dadurch die pulmonale Clearance von *P. haemolytica* erheblich [95, 217, 327].

Das Enzym konnte unseres Wissens bis heute nicht identifiziert werden, die Hydrolyseaktivität des partiell aufgereinigten Überstandes wurde jedoch vollständig gehemmt durch die Zugabe von EDTA, einem Inhibitor von Metalloproteasen. Da die Gcp eine Metalloprotease ist und die Autoren zudem in dem Überstand eines T3-Stammes, der kein *gcp* aufweist, keine Protease-Aktivität gegenüber IgG nachweisen konnten, vermutet man, dass die Glykoprotease möglicherweise das gesuchte Enzym mit der proteolytischen Funktion ist [183].

2.1.4.11 Superoxiddismutase

Die Lunge von Mensch und Tier ist aufgrund einer hohen Sauerstoffspannung vom sogenannten oxidativen Stress in besonderem Maße betroffen. Dem Angriff freier Sauerstoffradikale sind nicht nur eukaryotische Wirtszellen sondern auch eindringende prokaryotische Organismen ausgesetzt. Bakterien erlangen demnach durch die Produktion von Faktoren, die ihnen ein Entgehen des oxidativen Bursts ermöglichen, eine erhöhte Virulenz [168]. Dazu gehören Superoxid-Dismutasen (SOD), Metalloenzyme, die eine Konversion hoch toxischer Superoxid-Radikale, die während der Reduktion molekularen Sauerstoffs entstehen, zu Was-

serstoffperoxyd und Sauerstoff katalysieren. Man unterscheidet zytosolische [Kupfer, Zink]-, mitochondriale bzw. zytoplasmatische Mangan- und zytoplasmatische Eisen-SODs. [Kupfer, Zink]- SODs wurden lange als exklusive eukaryotische Enzyme angesehen, die das Zytosol und extrazelluläre Kompartimente höherer Organismen vor der Zerstörung durch freie Sauerstoffradikale bewahren. [Kupfer, Zink]- SODs und z.T. auch deren DNS-Sequenz wurden u.a. bei *H. influenzae*, *A. pleuropneumoniae*, *E. coli*, und *Salmonellen* identifiziert. Prokaryotische SODs schützen die Bakterien während eines respiratorischen Bursts in Phagozyten sowie vor Sauerstoff-Radikalen, die an Gewebeoberflächen und der Schleimhaut während der Kolonisation gebildet werden [15, 40, 171, 172].

Auch bei ovinen [*P.*] *haemolytica*-Stämmen identifizierte man eine periplasmatische [Kupfer, Zink]-SOD. Bei keinem der getesteten [*P.*] *haemolytica* A1- Isolate, jedoch bei allen A2-Stämmen konnte das Gen *sodC* mittels PCR nachgewiesen werden, während A7-Stämme variabel waren. Ein positives PCR-Ergebnis ging einher mit einer positiven [Kupfer, Zink]-SOD-Aktivität. Isolate aller übrigen Biotyp A-Serotypen sowie *P. trehalosi*-Stämme waren sowohl in der PCR als auch in der DNS-DNS-Hybridisierung negativ [177]. In einer anderen Studie wiesen 83,8 % aller [*P.*] *haemolytica* A1-Isolate und 75,2 % der A2-Isolate eine periplasmatische SOD-Aktivität auf, während die Aktivität des Enzyms bei 59,1 % der T10-Isolate im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte. Lediglich bei A2-Stämmen konnte man sicher identifizieren, dass es sich um eine [Kupfer, Zink]- SOD handelt, bei allen anderen Serotypen mit SOD-Aktivität konnten die Enzyme nicht näher charakterisiert werden [278].

Die vorwiegend periplasmatische Lokalisation der Enzyme indiziert ihre Aktivität gegen externes Superoxid, da zytosolisch gelegene freie Radikale nicht durch die zytoplasmatische Membran ins Periplasma gelangen können. Offensichtlich ist also nicht die Produktion der SOD selbst von Bedeutung, sondern die nachfolgende Bildung von Wasserstoffperoxid, das als freies Radikal ziliare Strukturen zerstört und einem respiratorischen Pathogen wie [*P.*] *haemolytica* über eine Störung der mukoziliaren Clearance den Übertritt in das respiratorische Gewebe ermöglicht [298].

Zusammenfassung

Die Auswertung der Literatur bezüglich der virulenzassoziierten Faktoren von *M. haemolytica* macht deutlich, dass sich in den letzten Jahren der Kenntnisstand zumindest

über die Existenz verschiedener Faktoren erweitert hat. Nach wie vor ist die pathogenetische Bedeutung der Virulenzdeterminanten jedoch nur in den wenigsten Fällen ausreichend erforscht und bei der Formulierung eines Pathogenesemodells müssen einige Fragen offen bleiben [100]. Durch die hoffentlich bald verfügbare *M. haemolytica*-Genomsequenz besteht in Zukunft die Möglichkeit, *in vivo* sowie *ex vivo* durch Analyse des Proteoms und des Transkriptoms den komplexen Vorgang der Regulation einzelner virulenzassoziiierter Faktoren aufzuklären, um so ein klares Bild von der Pathogenese der EBP skizzieren zu können.

2.2 *Pasteurella multocida* ssp. und *Pasteurella* spp.

2.2.1 Einführung

Pasteurella (P.) multocida verursacht zahlreiche, für die Veterinärmedizin ökonomisch relevante Erkrankungen weltweit (s. Tab. 3). Auch als Humanpathogen gewinnt *P. multocida* an Bedeutung, wobei Wundinfektionen, aber auch Septikämien, Meningitiden und Endokarditiden beschrieben werden. Seit der Erstisolierung von *P. multocida* als Infektionserreger im Jahre 1881 wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, Immunitätsmechanismen, Wirtsspezifität, Virulenz und Pathogenese von *P. multocida* aufzuklären. Trotz umfangreicher Forschungsaktivitäten und der im Jahr 2001 abgeschlossenen Genomanalyse eines Geflügelcholera-Isolates bleiben viele Fragen bezüglich molekularer Pathogenesemechanismen weitgehend ungeklärt. Schwierigkeiten bereiten dabei auch die hohe antigenetische Variabilität und das weite Wirtsspektrum von *P. multocida* sowie die unterschiedlichen Infektionsverläufe. Bisher beschriebene Virulenzfaktoren sind Adhäsionsfaktoren, eisenakquirierende Systeme, Anti-Wirtsabwehrsysteme, sowie das für die Entstehung der Rhinitis atrophicans ursächliche *P. multocida* Toxin (s. Kap. 2.2.4.7) [23, 24, 56, 91, 111, 211, 214, 228, 235]. Inwieweit einzelne dieser Faktoren in die Pathogenese der verschiedenen Erkrankungskomplexe involviert sind, ist jedoch für die wenigsten hinlänglich geklärt.

Die Diagnostik von *P. multocida* sowie seine Abgrenzung gegenüber anderen *P. species* bzw. *M. haemolytica* ist ein Problem insbesondere klassisch ausgerichteter Diagnostik-Laboratorien. Ausgedehnte molekularbiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung der bis dato bekannten virulenzassoziierten Gene bei *P. species* unterschiedlicher Erkrankungen und Wirte, die einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung einer

diagnostischen Methode in Form einer kostengünstigen und zeitsparenden Multiplex-PCR liefern könnten, liegen bis heute jedoch nicht vor.

Sichere und Serotyp-übergreifende Impfstoffe gegen *P. multocida*-Infektionen fehlen noch immer und bis vor kurzer Zeit gab es keine umfassende Charakterisierung des Organismus auf molekularer Ebene. Erst die Anwendung neuerer Technologien, wie der *in vivo* Expressions-Technologie (IVET) [144], der Signature Tagged Transposon Mutagenese (STM) [111], sowie der Erstellung eines Gesamt-Genom-Expressions-Profiles [29] zur Identifizierung *in vivo* relevanter Virulenzfaktoren und insbesondere die Entschlüsselung des *P. multocida*-Genoms eröffneten die Möglichkeit zur Erforschung der molekularen Biologie des Erregers und der Erweiterung des Verständnisses der molekularen Grundlage der Pathogenese der durch ihn hervorgerufenen mannigfaltigen Infektionskrankheiten [143, 211]. Ein Problem bei der Erforschung solch diverser Erkrankungskomplexe ist die Variabilität der Expression potentieller *P. multocida*-Virulenzgene in den unterschiedlichen Wirten. Dies hat sich bereits bei STM-Analysen gezeigt, die gleichzeitig an Mäusen und Hühnern als Infektionsmodellen durchgeführt wurden [127]. Zukünftige Transkriptom- und Proteomanalysen, die nun durch die Entschlüsselung des *P. multocida*-Genoms eines Geflügelcholera-Isolates möglich sind, müssen immer die unterschiedlichen Wirtsreservoirs des Mikroorganismus berücksichtigen, um fundierte Aussagen zur pathogenetischen Bedeutung der untersuchten Faktoren für eine der zahlreichen, durch *P. multocida* hervorgerufenen Infektionskrankheiten treffen zu können.

2.2.2 Taxonomische Einordnung der Gattung *Pasteurella*

Die Gattung *Pasteurella* ist eine heterogene Gruppe Gram-negativer Stäbchenbakterien und gehört ebenso wie die Gattung *Mannheimia* (s. Kap. 2.1.2) zu der aus derzeit sieben Gattungen bestehenden Familie *Pasteurellaceae* [9, 21, 239]. Der Gattungsname *Pasteurella* wurde erstmals von dem italienischen Grafen Trevisan zu Ehren der Forschungsarbeiten Louis Pasteur's auf dem Gebiet der Geflügelcholera vorgeschlagen. Bis 1932 bestand die Gattung *Pasteurella* nur aus der seit der sechsten Ausgabe in Bergey's Manual der systematischen Bakteriologie verzeichneten Typ-Spezies *P. multocida* – eine Bezeichnung, die auf das variable Wirtsspektrum des Mikroorganismus hinweisen sollte (multocid = vieltötend) [225].

Mit der Isolierung und Beschreibung zahlreicher neuer *Pasteurella*-Spezies wurde ihre Differenzierung auf der Grundlage phänotypischer Merkmalsausprägungen immer schwieri-

ger. Im Zuge von DNS-DNS-Hybridisierungen zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von *P. species* erfuhr die Gattung schliesslich eine Neueinteilung. Diese äußerte sich in der Konstituierung der aus 11 Spezies bestehenden Gruppe *P. sensu stricto* (s. Tab. 4) und in einem später auch durch DNS-rRNS-Hybridisierungen und 16S rRNS-Sequenzanalysen bestätigten Ausschluß u.a. von [*P.*] *haemolytica* aus der ursprünglichen Gattungseinteilung [84, 85].

Die Serotypisierung von *P. multocida*-Stämmen stellt nach wie vor ein Problem dar, da keine kommerziell erhältlichen Antiseren zur Bestimmung der O- und K-Antigene verfügbar sind und eine verlässliche Typisierung daher nur in wenigen Referenzlaboratorien durchgeführt werden kann. *P. multocida*-Stämme werden serologisch durch Kapselantigene (Serogruppe) und somatische Antigene (Serotyp) klassifiziert. Mit einem indirekten Hämagglutinationstest (IHA) erfolgt eine Differenzierung bekapselter Stämme in die Serogruppen A, B, D, E und F. Darüber hinaus existieren eine große Anzahl nicht typisierbare Isolate, die entweder neue Serovare, schwierig zu typisierende mukoide Kapseltyp A-Stämme oder tatsächlich kapsellose Stämme sind [272, 290].

Zur Bestimmung des somatischen Serotyps von *P. multocida* wurden zwei Methoden angewendet. Im „somatischen“ System von Heddleston et al. (1972) werden durch einen Geldiffusions-Präzipitationstest 16 (1-16) Serotypen unterschieden [128]. Dagegen beschreibt das heute seltener angewendete System nach Namioka und Murata 11 (1-11) somatische Serotypen auf der Basis eines Röhrchenagglutinationstests [226]. Beide Systeme sind nicht analog verwendbar, da die mit unterschiedlichen Verfahren bestimmten Serotypen zumeist nicht korrelieren und Isolate, die in einem System einem einzelnen somatischen Serotyp angehören, im anderen oft mehr als einen Serotyp repräsentieren [34].

2.2.3 *Pasteurella multocida* ssp. *multocida* und *Pasteurella*-Spezies als Infektionserreger

P. multocida tritt u.a. als Kommensale des ORT oder der Maulhöhle verschiedener Wirtstiere auf, verursacht aber als primär und sekundär pathogener Erreger in Abhängigkeit seines Kapsel- und Serotyps, der Virulenzeigenschaften sowie der Wirtsspezifität unterschiedliche Krankheitsbilder, die in Tab. 3 zusammenfassend dargestellt sind. *P. multocida* weist dabei eine besondere Affinität zu respiratorischen Organen auf, ist jedoch auch Verursacher von Septikämien und Wundinfektionen [276].

Tab. 3: Erkrankungskomplexe hervorgerufen durch *P. multocida ssp. multocida*

Erkrankungskomplex	assoziierter Kapsel-/[Serotyp]	Wirt
<i>Primäre Infektionen</i>		
Geflügelcholera	A [1, 3, 4], (F)* [1, 3, 4, 7, 12]	Alle Vogelarten
Hämorrhagische Septikämie (HS)	B, E [2, 5]	Wildwiederkäuer, Büffel, Rinder
<i>Sekundäre (multifaktorielle) Infektionen</i>		
Enzootische Bronchopneumonie (EBP)	A [3, 4], (D)* [3, 4, 12]	Rind (Schaf)
Bronchopneumonie	A; D [3, 11]	Schwein
Kaninchenschnupfen	A [12, 14]; (D)*	Kaninchen
Rhinitis atrophicans	D [3, 11]; (A)*	Schwein
Lokale Wundinfektionen nach Hunde- oder Katzenbissen bzw. -kratzern; sporadisch Meningitiden, Endokarditiden	keine Angaben	Mensch

* in runden Klammern werden die seltener mit den Erkrankungen assoziierten Kapseltypen angegeben

Auch andere Vertreter aus der Gattung *Pasteurella* verursachen diverse Erkrankungen bei den unterschiedlichsten Wirtstieren (s. Tab. 4). Sowohl die klassische als auch die molekulare Diagnostik der *Pasteurella*-Spezies und -Subspezies ist aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der Gattung sehr anspruchsvoll. Eine 16S- bzw. 23S rRNS-Diagnostik ist nur für wenige *Pasteurella*-Spezies etabliert.

Tab. 4: Klinische Bedeutung und natürliche Habitats der *Pasteurella* spp. und *Pasteurella* ssp. [20, 108] gemäß aktueller taxonomischer Einordnung nach Euzéby (2004)¹

Spezies	klinische Bedeutung	Wirtsspektrum	natürliches Habitat
<i>Pasteurella sensu stricto</i>			
<i>P. anatis</i> (<i>Gallibacterium anatis</i>)	gelegentlich Infektion des RT ²	Ente	physiologische Darmflora Ente
<i>P. avium</i> (Biovare 1 und 2)	gelegentlich Pneumonie (Biovar 2)	Rind	RT, Intestinum und Konjunktiva Geflügel
<i>P. canis</i> (Biovare 1 und 2)	Wundinfektionen	Säugetiere, Mensch	RT Hund und Kalb
<i>P. gallinarum</i>	Sinusitis, Aerocystitis, Salpingitis	Huhn	RT Huhn
<i>P. langaaensis</i>	pathologisches Potential unklar	Geflügel	RT Geflügel
<i>P. multocida (m.)</i> ssp. <i>m., septica, gallicida</i>	Infektionen des RT, Sepsis; (s. Tab. 1)	Säugetiere, Vögel, Mensch	RT Säugetiere und Vögel
<i>P. stomatis</i>	Infektionen nach Bissverletzungen	Hund, Katze, Mensch	RT Hund und Katze
<i>P. volantium</i>	pathologisches Potential unklar	Geflügel	RT Geflügel
<i>Pasteurella</i>-Spezies, die nicht zur <i>P. sensu stricto</i>-Gruppe gehören			
<i>P. aerogenes</i>	gelegentlich Aborte, Totgeburten, Bissinfektionen	Schwein, Hund, Kaninchen	physiologische Flora von Oropharynx und Darm bei Schweinen
<i>P. bettyae</i>	Infektionen des Urogenitaltraktes	Mensch	Urogenitaltrakt Mensch
<i>P. caballi</i>	Pneumonie, Peritonitis	Pferd	RT Pferd
<i>P. dagmatis</i>	Infektionen nach Bissverletzungen	Hund, Katze, Mensch	RT Hund und Katze
<i>P. lymphangitidis</i>	Lymphangitis	Rind	RT Rind
<i>P. mairii</i>	Aborte, Sepsis	Schwein (Ferkel)	Genitaltrakt Schwein
<i>P. pneumotropica</i>	Pneumonie, Konjunktivitis	Labortiere (Maus, Ratte, Hamster)	RT Hund, Katze, Hamster, Meerschweinchen, Ratte
<i>P. skyensis</i>	Infektiöse Erkrankung	Lachs	keine Angabe
<i>P. testudinis</i>	Infektionen des oberen RT, Abszesse	Schildkröten	RT Wüstenschildkröte
<i>P. trehalosi</i>	Septikämie	Schafe, (Ziegen)	RT kleiner Wiederkäuer

¹ Euzéby: List of bacterial names with standing in nomenclature; Society for Systematic and Veterinary Bacteriology (URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>)

² RT: Respirationstrakt

2.2.4 *Pasteurella multocida* ssp.: Virulenzfaktoren und deren pathogenetische Bedeutung

Obwohl eine Vielzahl virulenzassoziierter Faktoren bei *P. multocida* beschrieben worden sind und insbesondere auf dem Gebiet der Geflügelcholera seit mehr als einem Jahrhundert intensive Studien betrieben werden, ist die Pathogenese der meisten *P. multocida*-Infektionskrankheiten unbekannt. Lediglich die Ätiologie der Atrophischen Rhinitis ist durch die Identifizierung des pathogenetisch bedeutenden Dermonekrotoxins sowie der möglichen Coinfektion mit *Bordetella bronchiseptica* aufgeklärt. Im Jahre 2001 wurde die Genomanalyse des *P. multocida* Kapseltyp A-Isolates Pm70, isoliert aus einem Geflügelcholera-Geschehen, abgeschlossen [211]. Sieben Prozent des 2,26 Mega-Basenpaaren großen Genoms repräsentieren 104 putativ virulenzassoziierte Gene, deren Identifizierung neue Möglichkeiten zur Erforschung der molekularen Pathogenese von *P. multocida*-Infektionen darstellt. Die in Tab. 5 zusammenfassend dargestellten Faktoren sind die bis dato bekannten virulenzassoziierten Gene bzw. Genprodukte, die bei der Adhäsion an Wirtszellen, der Vermehrung des Mikroorganismus im und der Schädigung des Wirtsgewebes durch *P. multocida* eine wesentliche Rolle spielen. Molekulare epidemiologische Studien zum Vorkommen und zur Verbreitung dieser Virulenzfaktoren könnten einen wesentlichen Aufschluß über deren Bedeutung im pathogenetischen Prozess von *P. multocida*-Infektionen liefern und zudem klären, inwiefern einzelne dieser Faktoren evtl. spezifisch sind für bestimmte Kapseltypen, Erkrankungskomplexe, oder Tierarten, wie es z.B. für das *P. multocida* Toxin bekannt ist.

Tab. 5: Virulenzassoziierte Faktoren von *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*

Virulenzfaktor	Biologische Wirkung	Gene	Referenz
Nicht-Fimbrien-assoziierte Adhäsine ➤ <i>Pasteurella</i> filamentöses Häm <u>a</u> gglutinin 1/2 (PfhaB 1/2)	— Anheftung an Wirtszellen → Kolonisierung des Respirationstraktes (RT) — Serumresistenz (putativ)	➤ <i>pfhaB1/2</i>	[111, 211]
Fimbrien-assoziierte Adhäsine ➤ Typ1-Fimbrien ➤ Typ4-Fimbrien ➤ Curli-Fimbrien	— Anheftung an Epithelzellen des RT → Kolonisierung des RT — Immunmodulation	➤ unbekannt ➤ <i>ptf</i> ➤ unbekannt	[91, 111, 151, 211, 281]
Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex	— Inflammation — direkte Zytotoxizität — Immunmodulation	➤ <i>galE</i>	[104]
Kapsel	— unspezifische Adhäsion — Phagozytosehemmung — Schutz vor dem Membranangriffskomplex des Komplementsystems	➤ <i>cap A</i> (B:2) - Locus <u>Region 1:</u> <i>hexABCD</i> (<i>cexABCD</i>) <u>Region 2:</u> <i>hyaABCDE</i> (<i>bcbA-I</i>) <u>Region 3:</u> <i>phyAB</i> (<i>lipA, lipB</i>)	[28, 52]
Äußere Membranproteine ➤ OmpH ➤ P6-like-Protein ➤ Oma87-Protein	— unspezifische Adhäsion — Porinaktivität — Immunmodulation — Erhöhung der Expression und Sekretion von Zytokinen (<i>in vitro</i>) — Rearrangierung des Zytoskeletts über erhöhte Aktinpolymerisierung — Steigerung der chemotaktischen Aktivität neutrophiler Granulozyten	➤ <i>ompH</i> ➤ <i>psl</i> ➤ <i>oma87</i>	[113, 150, 162, 199, 204, 280]

Tab. 5 (Fortsetzung)

Virulenzfaktor	Biologische Wirkung	Gene	Referenz
Eisenakquirierungssysteme ➤ Siderophore (Multicidin) ➤ Transferrinbindendes Protein A (TbPA) ➤ ExbB-ExbD-TonB-Locus ➤ Hämoglobinbindende Proteine (HgbA/B)	— Multicidin und TbPA: Eisenrezeptoren in der äußeren Membran; Eisenentzug vom Wirt — TonB: Energiebereitstellung für die Translokation von Eisen über die äußere Membran — HgbA/B: spezifische Hb-Rezeptoren; Vermittlung der Internalisierung von Eisen und Hämin in die Zelle	➤ unbekannt ➤ <i>tbpA</i> ➤ <i>exbB-exbD-tonB</i> ➤ <i>hgbA/hgbB</i>	[23, 24, 65, 141, 235]
Lipoproteine ➤ Plp-40 ➤ GlpQ ➤ PCP (PAL cross-reacting protein)	— Plp-40: Verankerung der Polysaccharid-Kapsel an die Zelloberfläche — GlpQ: Hydrolyse von Glycerophosphodiestern; Förderung der Vermehrung von Bakterien im mukösen Layer — GlpQ und PCP: Induktion hoher Antikörpertiter, aber keine Immunmodulation	➤ <i>unbekannt</i> ➤ <i>glpQ</i> ➤ <i>pcp</i>	[43, 144, 190, 211]
Dermonekrotoxin (DNT)/ <u>Pasteurella multocida</u> Toxin (PMT)	— dermonekrotisierend und letal für Nagetiere, Vögel — osteoklastische Knochenresorption — mitogene Aktivität — Zytoskelettveränderungen <i>in vitro</i> — Immunmodulation	➤ <i>toxA</i>	[38, 39, 56, 146, 181, 246]
Enzyme ➤ Neuraminidasen (NanH/B)	— hydrolytische Freisetzung nährstoffreicher Sialinsäuren aus Wirtsglycosiden — Kolonisation des Wirtsgewebes	➤ <i>nanB / nanH</i>	[214]
➤ Superoxid-Dismutase (SodA / SodC)	— Schutz vor Phagozytose und Sauerstoffradikalen — Herabsetzung der mukoziliären Clearance	➤ <i>sodA/ sodC</i>	[172, 211]
➤ Immunglobulin G-Protease	— Degradierung von IgG, damit Unterstützung der Wirtskolonisierung	➤ unbekannt	[228, 257]

2.2.4.1 Adhäsionsfaktoren

Zu Beginn einer respiratorischen *P. multocida*-Infektion steht immer die nasopharyngeale Kolonisierung des entsprechenden Wirtsgewebes mit nachfolgender Adhäsion des Mikroorganismus an Strukturen des ORT. Neben unspezifischen Adhäsionsfaktoren wie der Kapsel, dem LPS-Komplex oder äußeren Membranproteinen sind bei den meisten mikrobiellen Infektionserregern für eine Adhäsion vor allem nicht-Fimbrien-assoziierte Adhäsine und Fimbrien verantwortlich.

2.2.4.1.1 Nicht-Fimbrien-assoziierte Adhäsine

Bis heute wurden Adhäsine bei *P. multocida* nicht eindeutig identifiziert, obwohl durch zahlreiche Hämagglutinations (HA)-Studien adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. So wurden bei *P. multocida* in der Vergangenheit sowohl eine Mannose-resistente HA (MRHA) bei Kapseltyp A-Stämmen von Kaninchen und Geflügel als auch eine Mannose-sensitive HA (MSHA) [106, 124, 245] beschrieben. Bei der Rhinitis atrophicans stellt sich immer wieder heraus, dass das an anderer Stelle beschriebene Dermonekrotoxin *in vitro* wie *in vivo* zur Adhäsion von *P. multocida* beiträgt, unabhängig davon, ob die Stämme Fimbrien tragen, hämagglutinieren oder welchen Kapseltyp sie aufweisen [250].

Pasteurella filamentöses Hämagglutinin

Im Rahmen des *P. multocida*-Genomprojektes stellte man fest, dass ca. 1% des gesamten Genoms für grosse Proteine mit einer Homologie zum Filamentösen Hämagglutinin FhaB von *B. pertussis* kodiert [211]. FhaB bestimmt bei *B. pertussis* die Adhäsion an die Wirtszellen und ist Hauptkomponente azellulärer Impfstoffe gegen den Keuchhusten beim Menschen [288]. Die zuvor bereits über eine Signature Tagged Transposon Mutagenese (STM) bei einem bovinen EBP-assoziierten *P. multocida*-Isolat identifizierten kodierenden Sequenzen *pfhaB1* (*Pasteurella filamentöses Hämagglutinin*) und *pfhaB2* sind 7,845 kb respektive 11,575 kb groß und haben bis auf eine große Deletion im Zentrum von *pfhB1* die gleiche Gensequenz, was die unterschiedliche Größe erklärt [111]. Die N-terminalen Enden von PfhaB1 und PfhaB2 weisen ein konserviertes Motiv auf, das man auch bei anderen Mitgliedern aus der Gruppe dieser großen Protein-Familie, wie z.B. LspA1 und LspA2 von *H. ducreyi* findet [318]. Des Weiteren weisen die zentralen Regionen der Proteine PfhB1 und PfhB2 zahlreiche Integrin-bindende Motive auf, die ebenfalls charakteristisch für diese Familie sind [282]. Eine dritte strukturelle Ähnlichkeit fanden die Autoren im C-Terminus der

Pasteurella-Proteine. Diese Region weist eine signifikante Ähnlichkeit (66 % AS-Identität) zum Serumresistenz-Protein p76 von *H. somnus* auf [55]. PfhaB1 und PfhaB2 scheinen also nicht nur an der Adhäsion des Mikroorganismus an Wirtszelloberflächen beteiligt zu sein, sondern auch über die Vermittlung einer Serumresistenz dem Mikroorganismus das Überleben im Wirt zu ermöglichen [211].

Zusätzlich zu den beiden Strukturgenen konnte im Rahmen der STM das zum *Bordetella pertussis fhaC* homologe *pfhaC* bei einem *P. multocida* Kapseltyp A-Stamm identifiziert werden, das für den Export des FHA benötigt wird [111]. Funktionelle Studien zur Verifizierung der bis dato nur auf strukturellen Daten gestützten Annahmen bzw. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung der potentiellen Adhäsine-Gene bei *P. multocida* liegen bis heute nicht vor. Durch die STM konnte jedoch gezeigt werden, dass *pfhaB1*- und *pfhaB2*-Mutanten eine deutliche Virulenzabschwächung im Maus-Infektionsmodell erfahren haben, was auf eine potentielle pathogenetische Rolle dieser beiden Faktoren bei einer *P. multocida*-Infektion hinweist [111]. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass das septikämische Maus-Modell weniger die pathogenetischen Vorgänge der EBP widerspiegelt als vielmehr die septikämisch verlaufenden *P. multocida*-Infektionen, wie Geflügelcholera und Hämorrhagische Septikämie (HS).

2.2.4.1.2 Fimbrien-assoziierte Adhäsine

Typ 1-Fimbrien

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung konnten bei toxinogenen *P. multocida* D-Stämmen zwei Fimbrien-Typen nachgewiesen werden. Der erste Typ ähnelt mit seiner starren Morphologie den *E. coli*-Typ1-Fimbrien, die als MSHA-Fimbrien die Adhärenz des Mikroorganismus an Erythrozyten zahlreicher Tierarten, Hefezellen sowie an andere Zelltypen vermitteln. Die Autoren fanden diesen Fimbrientyp auf 60 – 80 % der untersuchten *P. multocida*-Zellen in geringer Anzahl (3-5 Fimbrien pro Zelle) [151].

Curli

Der zweite Fimbrien-Typ ähnelt morphologisch den *E. coli* “curli“-Fimbrien, dünnen, aggregativen Oberflächenfasern, die an extrazelluläre Matrix und verschiedene Proteine binden können. Fimbrien-besetzte Zellen waren allerdings nicht in der Lage, an Erythrozyten und an immobilisierten Mucus des RT zu haften. Es ist also nach wie vor unklar, ob diese Strukturen *in vivo* als Adhäsionsfaktoren fungieren [151].

Typ 4-Fimbrien

Ruffolo et al. identifizierten 1997 starre Fimbrien bei einem A:1-Geflügelstamm, die morphologisch und auf der Basis der N-terminalen Sequenz als Typ4-Fimbrien klassifiziert wurden. Dieser bei einer Vielzahl Gram-negativer Spezies als Schlüsselement in der Anheftung der Mikroorganismen an die epithelialen Wirtszell-Oberflächen identifizierte Fimbrien-Typ besteht aus einer einzigen, sich wiederholenden fimbrialen Protein-Untereinheit mit einem Molekulargewicht (MG) von 15 bis 20 kDa und einer hoch konservierten N-terminalen Sequenz. Diese Untereinheit wird aus der Zelle exportiert und über einen komplexen Mechanismus zum fimbrialen Strang polymerisiert, der einen Durchmesser von 6-7 nm hat und eine Länge von bis zu 25 µm erreichen kann. Die N-terminale Sequenzierung der 18 kDa großen Untereinheit PtfA von *P. multocida* zeigte, dass die ersten 21 AS eine große Ähnlichkeit (75 % Sequenz-Identität) zu N-terminalen Sequenzen anderer klassischer Typ4-Fimbrien-Untereinheiten, wie dem FimA von *Dichelobacter (D.) nodosus* oder dem HtfA von *H. influenzae* aufweisen [151, 281].

Es besteht eine Antigenverwandtschaft zu anderen Typ4-Fimbrien. So erkennt Anti-Typ 4-Antiserum von *P. multocida* rekombinantes *Moraxella (M.) bovis* β-Pilin und die native *D. nodosus* Fimbrien-Untereinheit FimA. Diese Kreuzreaktivität beruht vermutlich auf den hoch konservierten aminoterminalen Domänen der Proteinuntereinheiten. FimA und β-Pilin stellen bereits die Basis effektiver Impfstoffe gegen die Moderhinke beim Schaf bzw. die Infektiöse bovine Keratokonjunktivitis beim Rind dar. Ob auch das *P. multocida* PtfA in Zukunft in dieser Weise genutzt werden kann, muss in Untersuchungen zur Immunogenität und Verbreitung dieser Fimbrien-Untereinheit geklärt werden [281].

Die DNS-Sequenzanalyse verschiedener *ptfAs* und die Feststellung, dass diese innerhalb verschiedener Stämme erheblich variiert, limitiert die Effektivität einer Sero- bzw. Kapseltyp-übergreifenden Vakzine auf der Grundlage des Fimbrienantigens jedoch wahrscheinlich erheblich [91].

Die Expression der Fimbrien unterliegt offensichtlich einer Regulation durch die bei der Kultivierung vorhandene Sauerstoffspannung. Unter aeroben Bedingungen produzieren weniger als 40 % der *P. multocida*-Zellen Fimbrien, während es unter mikroaerophilen Bedingungen mehr als 70 % sind [281]. Übertragen auf die *in vivo*-Bedingungen bedeutet dies für die Mikroorganismen, die als Besiedler der Schleimhäute des RT einer mikroaeroben Umgebung begegnen, eine gesteigerte Funktionalität durch eine erhöhte Fimbrienexpression.

2.2.4.2 Polysaccharid-Kapsel

P. multocida ssp. multocida-Stämme werden mittels des IHA-Tests über Kapsel-assoziierte spezifische Antigene in die mit bestimmten Erkrankungskomplexen assoziierten Serogruppen A, B, D, E und F differenziert (s. Tab. 3) [41, 273]. Im Sinne eines besseren Verständnisses von Pathogenese und Wirtsspezifität konzentrierte sich das Interesse der Forschung insbesondere auf die Identifizierung der Kapselstrukturen.

P. multocida Serogruppe A-Kapseln bestehen hauptsächlich aus Hyaluronsäure, einem linearen Polysaccharid aus alternierenden D-Glucuronsäure- und N-Acetyl-D-Glucosamin-Anteilen [243, 277]. Es handelt sich dabei, wie auch bei den später beschriebenen Kapselsubstanzen Chondroitin und Heparosan, um Glykosaminoglykane, die ein strukturell ähnliches Pendant im eukaryotischen Wirt haben. Hyaluronsäure findet man beispielsweise bei Säugertieren und Vögeln als essentielle Struktur- und Erkennungs-Komponente in der Haut, der synovialen Gelenkflüssigkeit und dem Glaskörper des Auges [180]. Durch eine Art „molekularen Mimikris“ ist die Antikörper-Reaktion auf die hyaluronsäurehaltige A-Kapsel wie auf Glykosaminoglykane allgemein entweder sehr limitiert oder nicht existent, wodurch dem Kapselmaterial eine bedeutende Rolle in der Evasion der Wirtsabwehr durch Phagozytose- und Serumresistenz zukommt [81]. Die Hauptkomponente der A-Kapsel wird durch die Hyaluronsäure-Synthase (PmHAS), die erstmals bei einem Geflügelcholeraisolat identifiziert werden konnte, polymersiert [79]. Neben der PmHAS scheint das spezifische Bindungsprotein Aggrecan über eine noch nicht näher bestimmte Interaktion mit der Hyaluronsäure eine Rolle in der Polymerisierung des Kapselmaterials von A-Stämmen einzunehmen [80].

Die Hauptkomponente in der Kapsel von Serogruppe D-Isolaten ist das Heparinderivat Heparosan, das durch die Heparosan-Synthase (PmHS) synthetisiert wird [82]. Dekapsulations-Profile und die Identifizierung einer Chondroitin-Synthase (PmCS) in Serogruppe-F-Stämmen führten zu dem Schluss, dass deren Kapsel in erster Linie Chondroitinsulfat enthält. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der PmCS zur PmHAS (87 % identisch auf DNS- und AS-Ebene) wurde über einen gemeinsamen evolutionären Ursprung beider Enzyme diskutiert [81]. Da man bei A- bzw. F-Stämmen auch von „major“ respektive „minor“ Geflügelcholera-Pathogenen spricht, liegt die Vermutung eines gemeinsamen ancestralen Enzyms nahe. Dessen Spezifität könnte sich infolge einiger Mutationen, die wiederum in einem anderen Kapseltyp resultierten, geändert haben [81, 273].

Die genetische Aufschlüsselung eines *P. multocida* Kapsel-Biosynthese-Locus (*cap*-Locus) gelang erstmals mit der Identifizierung der Genregion eines Geflügelcholera-A:1-Isolates [52]. Diese Region ist in Anlehnung an die *cap*-Organisation von *E. coli* Gruppe II-Isolaten in drei Bereiche aufgeteilt [274]. Die Region 1 bildet einen durch die Gene *hexABCD* kodierten, in den Export des Polysaccharidmaterials an die Zelloberfläche involvierten Komplex. Die Region 2 wird gebildet von den Genen *hyaABCDE*, die für Proteine kodieren, die an der Bildung aktivierter Zucker-Monomere und dem Zusammenbau des Polysaccharid-Polymers beteiligt sind. Eine Modifikation des Kapselmaterials erfolgt über die durch die Region 3-Gene *phyAB* kodierten Strukturen, die eine Phospholipid-Substitution der Hyaluronsäure vor der Translokation vornehmen.

Kurze Zeit später erfolgte die Bestimmung der genetischen Organisation des 20,4 kbp großen *cap*-Locus eines B:2-Stammes, dessen Organisation ebenfalls der von *E. coli* Gruppe II-Isolaten entsprach [28]. Ein Vergleich des A:1 – mit dem B:2-*cap*-Locus führte die Autoren zu der Feststellung, dass die chromosomale Position der Genregionen und die sie umgebende DNS-Sequenz mit einer Identität von über 99 % hoch konserviert sind.

Detaillierte Informationen zu den *cap*-Loci der Serogruppen D, E und F fehlen bis heute. Allerdings wurde auf der Basis der bereits bekannten DNS-Sequenzen ein Typisierungssystem vorgeschlagen, das auf dem Nachweis ausgewählter Gene der hoch konservierten Region 2 des *cap*-Locus der fünf *P. multocida*-Kapseltypen basiert. Diese Multiplex-PCR (**P**olymerase **c**hain **r**eaction) zum gleichzeitigen Nachweis aller Kapselgruppen wurde als Alternative zu derzeit angewendeten häufig unzuverlässigen serologischen und nicht-serologischen Typisierungsmethoden vorgeschlagen [290, 310].

Wie bereits eingangs erwähnt, üben bakterielle Polysaccharid-Kapseln sowohl außerhalb des Wirtsorganismus als auch im Zuge des Infektionsprozesses vielfältige Funktionen aus [274]. Für *P. multocida*-Isolate der Serogruppe A konnte im Vergleich zu einer spontan kapsellosen Variante des gleichen Stammes eine starke Adhärenz an HeLa-Zellen sowie an Luftsack- bzw. Alveolar-Makrophagen von Puten ohne eine Internalisierung des Mikroorganismus nachgewiesen werden [260].

Eine schwache, vermutlich auf einer Interaktion mit dem auf kultivierten Blutmonozyten exprimierten Hyaluronsäure-bindenden Zelloberflächen-Glykoprotein CD44 basierende, Adhärenz an periphere Blut-Monozyten von Puten wurde für A-Stämme beschrieben [259, 260]. In einer neueren Studie bewirkte die Depolymerisierung der Kapsel-Hyaluronsäure eine ver-

stärkte Adhäsion von *P. multocida*-Isolaten an Hühner-Embryo-Fibroblasten (CEF). Die Autoren identifizierten ein in der Kapsel lokalisiertes, von der Hyaluronsäure maskiertes, antigenetisches Protein mit einem MG von 39 kDa, das sie für die Adhäsion aviärer *P. multocida*-KapseltypA-Stämme an die CEF-Zellen verantwortlich machten und als einen bedeutenden Virulenzfaktor interpretierten [22].

Bekapselte Stämme von *P. multocida* können eine höhere antiphagozytotische Resistenz aufweisen als spontan dekapulierte Derivate oder Stämme, bei denen die Kapsel chemisch entfernt oder im Falle der A-Kapsel durch eine Hyaluronidase-Behandlung reduziert wurde [6, 251, 260]. Darüber hinaus fanden Boyce und Adler einen siebenfachen Anstieg der Phagozytose-Sensitivität bei einer *cexA*-Mutante eines B:2-Stammes im Vergleich zum bekapselten Wildtypstamm, die sich in einer Clearance der Bakterien aus dem Blut infizierter Mäuse in weniger als vier Stunden äußerte [27, 28]. Während einige Studien diesen positiven Zusammenhang zwischen der Kapseldicke und der Phagozytoseresistenz des Mikroorganismus indizierten, fanden Jaques et al. (1994) heraus, dass die Kapseldicke – eisenlimitierende Bedingungen führen beispielsweise zu einer bedeutend geringeren Synthese an Kapselmaterial – nicht immer mit der Virulenz des Mikroorganismus korrelierte [126, 152].

Die im Transport des Kapselmaterials defiziente *hexA*-Mutante eines A-Stammes war sensitiver gegenüber dem bakteriziden Effekt des Serums. Bei einer kapsellosen *cexA*-Mutante eines B-Stammes hingegen war eine Veränderung in Bezug auf die Serumsensitivität nicht zu beobachten. Sowohl in einem Maus- als auch in einem Huhn-Modell war die *hexA*-Mutante eines Geflügelcholera-Stammes deutlich weniger virulent. Ebenso war die genetisch definierte, in der Polysaccharid-Biosynthese defiziente *bcbH*-Mutante eines B-Stammes, 10⁶-mal weniger virulent für Mäuse als der bekapselte Wildtyp [27, 51].

Während die Kapsel bei *H. influenzae* die Grundlage zugelassener Vakzinen bildet, konnte man im Gegensatz dazu beispielsweise für *A. pleuropneumonie* zeigen, dass gerade Kapsel-defiziente Stämme zu einer signifikanten Protektion führten [118, 148]. Ein Vakzinierungsversuch mit der schon erwähnten *bcbH*-Mutante eines *P. multocida* B-Stammes, die keine immunoreaktiven Polysaccharide mehr produzieren kann, hat gezeigt, dass immunisierte Mäuse je nach Applikationsart zu 50 bis 90 % gegen einen heterologen Challenge geschützt waren [27].

2.2.4.3 Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex

Der LPS-Komplex von *P. multocida* besitzt ähnliche chemische und biologische Eigenschaften wie der raue LPS-Typ anderer Gram-negativer Bakterien [56]. Aufgereinigtes LPS von 16 Serotyp-Referenzstämmen ergab allerdings keinen Hinweis für die Existenz von O-Antigenen, ähnlich derer von *Enterobacteriaceae* [270]. Bei der Untersuchung der LPSs verschiedener *P. multocida*-Stämme von Puten mit Hilfe einer Lektin-Affinitäts-Analyse zeigte sich eine mit Virulenzunterschieden korrelierende Variation in den LPS-Strukturen, gemessen an einer unterschiedlichen Adhärenz der Isolate an Epithelzellen, der Komplement-resistenz und der Pathogenität für Puten [67].

Im Rahmen eines Infektionsversuches, bei dem Schweine intrabronchial mit *P. multocida* infiziert wurden, sollten die pathophysiologischen Wirkungsmechanismen des LPS sowie sein Einfluss auf ausgesuchte Parameter, wie die Expression des LPS-Rezeptors CD14 und die direkt messbare Bindung von LPS-Molekülen an Alveolar-Makrophagen, Peritoneal-Makrophagen und periphere Blut-Monozyten näher untersucht werden. Die intrabronchiale Infektion resultierte in lokalen und systemischen Veränderungen der CD14-Expression und der LPS-Bindungskapazität verschiedener Zellpopulationen. Eine direkte Korrelation zwischen CD14- und LPS-Bindung bestand jedoch nach Meinung der Autoren nicht. Sie schlossen eine CD14-unabhängige LPS-Bindung nicht aus [16].

P. multocida LPS ist immunogen, das Ausmaß der einer Immunisierung folgenden Antikörper-Reaktion ist jedoch abhängig von der Versuchstierspezies, dem verwendeten LPS-Typ und der Inokulationsroute. Bei Vögeln gilt das *P. multocida*-LPS als Hauptimmunogen und wird als notwendiger Bestandteil von Vakzinen gegen die Geflügelcholera angesehen, weil es zumindest eine Protektion gegen einen homologen Challenge vermittelt. Die Rolle des LPS als Komponente in Impfstoffen bei Säugetieren bleibt dagegen kontrovers, weil Mäuse, Rinder und Kaninchen nach einer Immunisierung mit LPS nicht ausreichend oder gar nicht geschützt sind [56, 105, 284].

Ein in die LPS-Biosynthese involviertes Gen ist das 1.017 bp große *galE*, das – genau wie das gleichnamige Gen bei *M. haemolytica* – für eine UDP-Galaktose-4-Epimerase (GalE) kodiert, die an der Konversion von UDP-Glukose in UDP-Galaktose, einem Haupt-Precursor-Molekül in der LPS- und Kapsel-Biosynthese von *P. multocida*, beteiligt ist. *GalE*-Mutanten können dementsprechend in Glukose-reichen Medien keine Wildtyp-LPS-Strukturen auf ihrer

Zelloberfläche ausbilden. Eine intraperitoneal applizierte *P. multocida galE*-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp für Mäuse 200mal weniger virulent und produzierte kaum noch septikämische Verläufe bei den Versuchstieren, was durch die fehlende Isolierung von Mutanten aus dem Herz bestätigt wurde. Eine weitere Virulenzabschwächung der *galE*-Mutante durch zusätzliche Mutationen würde sie zu einem vielversprechenden Kandidaten für eine attenuierte Lebendvakzine gegen *Pasteurella*-Infektionen machen [104].

2.2.4.4 Äußere Membranproteine

In zahlreichen Studien wurden bei *P. multocida ssp. multocida* eine Vielzahl äußerer Membranproteine (OMPs) unterschiedlicher Struktur und Funktion identifiziert. Neben der Untersuchung ihrer Funktion *in vivo* sowie ihrer pathogenetischen Rolle während einer Infektionserkrankung, zielten die Studien insbesondere auf die Überprüfung des immunogenen Potentials der meist Oberflächen-exponierten Strukturen ab. Aufgrund der großen Variabilität des Mikroorganismus – basierend auf verschiedenen somatischen und Kapsel-Antigenen – lag der Schwerpunkt der meisten Arbeiten auf der Identifizierung kreuzprotektiver Proteine.

2.2.4.4.1 OmpH

ProteinH (= OmpH) ist eines der Hauptproteine der äußeren Membran von *P. multocida* [202]. Die Sequenzdaten des N-Terminus von Protein H eines Serotyp D:2-Stammes indizierten dessen nahe Verwandtschaft zur Superfamilie der nicht-spezifischen Porine der γ purple Eubakterien, insbesondere zum *E. coli* OmpC und *H. influenzae* P2-Porin [47]. Porine sind transmembrane Proteine, die wassergefüllte Kanäle in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien bilden. Diese wird dadurch semipermeabel und erlaubt als molekulares Sieb die Diffusion kleiner hydrophiler Komponenten [125]. Darüber hinaus können Porine auch als Rezeptoren für Bakteriophagen und Bakteriocine dienen [149]. Ihre auf der Bakterienoberfläche exponierten Epitope verleihen den in einer Bakterien-Familie hoch konservierten Porinen eine hohe Immunogenität, die sie nicht zuletzt zu attraktiven Vakzine-Kandidaten machen [279].

Der 1.059 bp große ORF des das Porin H kodierenden Gens *ompH* eines *P. multocida* Serotyp A:1-Stammes kodiert für ein 37,5 kDa großes Vorläuferprotein aus 353 AS inklusive eines 20 AS großen Signalpeptids, das für die Translokation des Proteins zur äußeren Membran benötigt wird. Die größte Ähnlichkeit des hitzemodifizierbaren Homo-Trimers besteht

zum *H. influenzae* Porin-Protein P2 mit einer Identität von 38 % in der AS-Sequenz. Während das mature rekombinante Protein rOmpH erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden kann, ist das Vorläuferprotein mit dem Signalpeptid letal für die Zellen. Natives OmpH hat im Bilayer der bakteriellen Membran eine porenbildende Funktion und induziert einen homologen Schutz bei Hühnern. Das rekombinante Protein weist dagegen keine Porinaktivität auf und induziert nur eine geringe Protektion gegen einen *P. multocida*-Challenge. Dies erklären sich die Autoren damit, dass das scheinbar denaturierte Protein keine Antikörper gegen die Epitope des nativen, nicht denaturierten OmpH induzieren kann [203].

Die *ompH*-Gensequenz ist innerhalb der Subspezies *P. multocida* ssp. *multocida* hoch konserviert, wie die Autoren in einem späteren Vergleich der Sequenzdaten von 15 Serotypen feststellten. Eine Ausnahme bilden zwei variable Bereiche, die auf die Präsenz von zwei sogenannten externen Loops in der Proteinstruktur hinweisen. Die Autoren stellten ein zyklisches, synthetisches Peptid (Cyclic-L2) her, das den in der DNS-Sequenz indizierten Loop2 als Epitop in seiner nativen Konformation repräsentierte. Bei einem Einsatz dieses Peptids in einem Impfversuch mit Hühnern waren diese zu 70 % gegenüber dem Challenge mit einem virulenten *P. multocida* A:1-Stamm geschützt [204].

Der regulatorische Einfluss verschiedener metabolischer Signale auf die *ompH*-Expression wurde mit Hilfe einer *ompH-lacZ*-Fusion untersucht. Man stellte fest, dass die Expression von *ompH* in Gegenwart eines Eisenchelators erhöht war. Eine *fur*-Mutante, die nicht mehr in der Lage war, ein als Repressor fungierendes Eisen-reguliertes Protein zu exprimieren, zeigt eine fünfmal höhere basale *ompH*-Expression als der Wildtypstamm. Die Expression scheint also negativ reguliert zu sein durch das Fur-Protein, dessen Bindungsstelle übereinstimmend mit diesen Resultaten durch einen Genabschnitt stromaufwärts des *ompH* kodiert wird. Ähnlich wie bei den unter kataboler Repression stehenden Porinen *ompA* und *ompB* von *E. coli* wird die Expression des *P. multocida*-Porins durch Glukose gehemmt. Entsprechend findet man stromaufwärts des Translations-Startpunktes von *ompH* eine Sequenz, die eine Bindungsstelle für ein zyklisches AMP-Rezeptor-Protein darstellt [26].

Neben seiner Funktion als nicht-spezifischem Porin bewirkt OmpH *in vitro* eine signifikante Erhöhung der Expression und Sekretion verschiedener Zytokine durch Mäuse-Milzzellen und ist dadurch in der Lage, inflammatorische und immunologische Reaktionen zu modulieren [150]. Darüber hinaus induziert Porin H bei bovinen neutrophilen Granulozyten

eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktinpolymerisierung und der chemotaktischen Aktivität. Eine ebenso Dosis-abhängige Variation wurde beim oxidativen Burst beobachtet [113]. Monoklonale Antikörper gegen OmpH liefern Mäusen einen passiven Schutz gegen eine Infektion mit *P. multocida*. Es zeigte sich eine verstärkte Phagozytose und Hemmung der Proliferation des Mikroorganismus in den Lungen als Ergebnis eines erhöhten Einstroms von neutrophilen Granulozyten zur Infektionsstelle [210]. Des Weiteren hemmen OmpH-spezifische Antikörper die Bindung von *P. multocida* an die respiratorische Schleimhaut-Oberfläche von Rindern *in vitro* [199].

2.2.4.4.2 P6-like-Protein

Das 453 bp große Gen *psl* (**P6 (six)-like**) kodiert für ein *P. multocida*-Homolog des P6-OMPs von *H. influenzae*. In nativer Form konnte das *Pasteurella*-P6-Protein im Infektionsmodell eine protektive Immunität gegen eine *H. influenzae*-Infektion bewirken, die jedoch bei der Gabe von rekombinantem Protein an Puten nicht reproduziert werden konnte. Das 16 kDa grosse P6-like-Protein Psl von *P. multocida* wurde, weil es bei allen 16 *P. multocida* ssp. *multocida*-Serotypen nachgewiesen werden konnte, dennoch als potentieller Vakzinekan-didat angesehen. Der Nachweis des P6-like-Proteins in Form des kodierenden Gens *psl* wurde außerdem als Spezies-spezifisches Diagnostikum vorgeschlagen [161, 162].

2.2.4.4.3 Omp28-Protein

Marandi und Mittal identifizierten 1996 ein hitzomodifizierbares Hauptprotein der äußeren Membran eines *P. multocida*-Isolates der Kapselgruppe B mit einem MG von 28 kDa [209]. Die N-terminale Sequenz dieses OMPs weist eine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen der OmpA-Porinfamilie auf. Immunologisch ist das Protein bei allen Referenzstämmen der fünf Kapseltypen und 16 Heddleston-Serotypen nachweisbar. Auch Gatto et al. (2002) charakterisierten ein 28 kDa großes, hitzomodifizierbares Omp eines *P. multocida* A:3-Stammes immunologisch und strukturell. Obwohl die N-terminale Sequenz darauf hinwies, dass es ein Mitglied der OmpA-Porinfamilie war, konnte keine Porinaktivität im Bilayer der Membran nachgewiesen werden. Mäuse, die mit aufgereinigtem Omp28 immunisiert wurden, entwickelten einen signifikanten Antikörper-Titer, waren aber nicht gegen einen homologen intraperitonealen Challenge geschützt. Obwohl Omp28 Oberflächen-exponiert ist und die Bildung von Antikörpern induziert, scheint es nicht geeignet für die Stimulierung einer Immunität gegen eine *P. multocida*-Infektion zu sein [116].

2.2.4.4.4 **Oma87-Protein**

Das bei einem *P. multocida* A:1-Stamm identifizierte, durch das 2.372 bp große Gen *oma87* kodierte 85,5 kDa-Protein Oma87 ist ein OMP, das mit einem Signalpeptid über die innere Membran transloziert wird. Mit einer AS-Identität von 75 % zeigt es eine große Ähnlichkeit zu dem protektiven 80 kDa-OMP D15 von *H. influenzae* [197, 280]. Antiserum gegen Oma87-Protein liefert passiven homologen Schutz für Mäuse. Da die protektiven Epitope von *H. influenzae*-D15 am N-Terminus des Proteins lokalisiert wurden, stellte man ein Oma87-Fusionsprotein her, das 25 % der N-terminalen Sequenz des Proteins enthielt. Eine Immunisierung von Hühnern mit diesem Serogruppe D-Fusionsprotein schützte diese jedoch nicht gegen einen Challenge mit *P. multocida* A:1, obwohl die Oma87-Sequenz der beiden Stämme zu > 95 % identisch war [331].

2.2.4.5 **Eisenregulierte äußere Membranproteine**

Auf die Bedeutung von Eisen für Mikroorganismen und dem Siderophor- bzw. Transferrin-Rezeptor-vermittelten Mechanismus zur Akquirierung dieses essentiellen Wachstumsfaktors wurde bereits im Kapitel 2.1.4.5 hingewiesen. Das erst kürzlich abgeschlossene *P. multocida* Genom-Projekt hat gezeigt, dass mehr als 2,5 % des Genoms, d.h. insgesamt 53 kodierende Sequenzen, Gene sind, die für Protein-Homologe kodieren, die bei anderen Mikroorganismen in die Eisenaufnahme involviert sind [211]. Bereits vor der Beendigung des Genom-Projektes, dessen Daten ausschließlich auf Vergleichsstudien der identifizierten Sequenzen mit bekannten Datenbankeinträgen basieren, konnten bei *P. multocida* Komponenten beider o. g. Strategien zur Eisenaufnahme nachgewiesen und teilweise *in vitro* charakterisiert werden.

2.2.4.5.1 **Siderophore**

Hu et al. (1986) wiesen die Präsenz eines wachstumsfördernden Faktors bei unter Eisenrestriktion kultivierten *P. multocida*-Stämmen nach, der in Anlehnung an die zuvor von Neilands und Ratledge (1982) festgelegten Kriterien als Siderophore klassifiziert wurde [141, 230]. Eine Zuordnung der *Pasteurella* Siderophore zum klassischen Phenolat- oder Hydroxamat-Typ war jedoch aufgrund der sich erheblich unterscheidenden chemischen Struktur nicht möglich. Sie wurde als Multicidin bezeichnet [230]. Unter Eisenmangel-Bedingungen kultivierte *P. multocida* Kapseltyp A-Zellen, die Eisen-regulierte äußere Membranproteine (I-ROMPs) mit einem MG von 76, 84 und 94 kDa exprimieren, können an Multicidin

komplexiertes Eisen verstärkt binden, was vermutlich auf die Präsenz spezifischer Bindungs-Epitope auf den drei IROMPs zurückgeht [48]. Bis heute liegen weder Untersuchungen zur Entschlüsselung des genauen Mechanismus der Multicidin-vermittelten Eisenaufnahme vor, noch ist das entsprechende Gen bekannt, das für diesen Faktor kodiert.

2.2.4.5.2 Transferrinbindende Proteine

Verschiedene Studien beschrieben die Präsenz von Transferrin-Rezeptoren bei *P. multocida* Kapseltyp A- bzw. Kapseltyp B-Stämmen, isoliert von Rindern mit EBP respektive HS. Bei einem Kapseltyp A-Stamm wurde das TbP 1 identifiziert und dessen Interaktion mit der bilobären Struktur des bovinen Transferrins aufgeklärt [335]. Veken et al. (1994) wiesen bei einem Serotyp B:2,5-Stamm nur ein einziges, 82 kDa IROMP nach, das eine spezifische Bindung zu bovinem Transferrin aufwies. Ein *P. multocida* B:3,4-Stamm, der ebenfalls eine HS bei wildlebenden Wiederkäuern hervorrief, exprimiert dagegen keine TbPs [314]. Ein Transferrin-Rezeptor mit einem MG von 82 kDa konnte über eine Affinitäts-Isolierungstechnik mittels immobilisierten bovinen Transferrins bei sechs von neun getesteten *P. multocida* A1-Isolaten separiert werden. Es wurden keine zusätzlichen Rezeptorproteine nachgewiesen. Das isolierte Protein konnte ruminales, nicht aber porcines oder humanes Transferrin binden, wobei primär Regionen des N-Lobes des bovinen Transferrins an der Bindung beteiligt waren. Die Sequenzierung der Transferrin-Rezeptor-Genregion und Vergleiche der DNS-Sequenz mit bekannten TbPs-kodierenden Genen zeigten, dass es sich um das Gen *tbpA* und entsprechend das Protein TbP1 handelte. Man fand hier nicht die operonale Struktur *tbpB-tbpA*, die man von anderen Spezies, wie auch von *M. haemolytica* kennt. Vielmehr ist bei dem hier untersuchten Isolat das *tbpA* flankiert von einem Leucyl-tRNS-Synthetase-Gen stromauf- und einem Insertionselement stromabwärts des Gens. Eine ähnliche Genanordnung fanden die Autoren in allen sechs Rezeptor-positiven Stämmen. Aufgrund der Präsenz von Komponenten mobiler Elemente hielten die Autoren eine Transposition des Genabschnittes für wahrscheinlich. Eine Akquirierung des Transferrin-Rezeptor-Gens muss der Grund dieses genetischen Arrangements sein, sofern nicht die gesamte Region um das *tbpA* ein Teil eines größeren mobilen genetischen Elements war, das zwischen verschiedenen genomischen Linien übertragen wurde [235].

Das *P. multocida* TbP1 unterscheidet sich in mehreren Punkten von dem anderer Spezies. Die Identität auf der AS-Ebene liegt im Vergleich zu den TbP1 anderer Spezies lediglich zwischen 45 und 50 %. Ausserdem ist das *P. multocida* TbP1 um 20 kDa kleiner als zuvor

charakterisierte TbP1, was durch das Fehlen von Protein-Strukturen bedingt ist, die bei anderen Spezies vermutlich für die Interaktion mit dem TbP2 benötigt werden. Obwohl kein TbP2 bei *P. multocida* Kapseltyp A-Stämmen identifiziert werden konnte, nutzten diese Isolate genauso effektiv wie *M. haemolytica* bovines Transferrin als Eisenquelle. Die Autoren spekulierten, dass das TbP2 seine Bedeutung nur unter bestimmten Bedingungen erlange, bzw. eine zusätzliche Rolle in anderen, noch unbekanntenen Mechanismen einnehme. Ein weiterer Unterschied ist, dass *P. multocida* TbP1 primär an die Regionen des N-Lobes bovines Transferrins bindet, im Gegensatz zu den anderen TbP1, die ausschließlich mit dem C-Lobe interagieren [235]. *P. multocida* TbP1 repräsentiert damit eine separate Subfamilie TonB-abhängiger Rezeptoren, die mit *tbpA* des Schafpathogens *Histophilus ovis*, das kürzlich sequenziert wurde und für ein dem *P. multocida* TbP1 nahezu homologes Protein kodiert, ein weiteres Mitglied bekommen hat [98]. Der in die Energiebereitstellung involvierte Genlocus *exbB-exbD-tonB* konnte durch die Komplementierung einer *E. coli tonB*-Mutante kloniert werden. Die Expression der unabhängig voneinander transkribierten Gene ist eisenreguliert [23].

Das protektive Potential von IROMPs und TbPs wird seit vielen Jahren untersucht. Während Glisson et al. (1993) selbst bei sehr niedrigen Challenge-Dosen nur widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Stimulation einer Kreuz-Immunität durch *P. multocida* Kapseltyp A-IROMPs fanden, stellten Confer et al. (2001) fest, dass eine intranasale Vakzinierung von Kaninchen mit IROMPs eines *P. multocida* A:3-Stammes die Bildung mukosaler und systemischer Antikörper stimulierte. Die Bakterienanzahl in der Nase der Tiere war signifikant reduziert und es bestand ein Schutz gegen einen homologen Challenge [60, 117].

2.2.4.5.3 Hämoglobin-bindende Proteine

Der Großteil extrazellulären Eisens im Wirt ist gebunden an hoch affine Eisen-Bindungsproteine. Die Akquirierung von Hämin ist komplizierter als die von Eisen, da das meiste Hämin an Hämoproteine gebunden ist und zudem intrazellulär lokalisiert ist in Erythrozyten (Hämoglobin), Granulozyten (Myeloperoxidase) und Muskelzellen (Myoglobin). Dennoch stellt Hämin eines der wichtigsten Eisenressourcen für Bakterien im Wirt dar [65].

Ein in die Akquirierung von Eisen in Form von Hämin involviertes Protein wurde vor kurzer Zeit bei einem *P. multocida*-Kapseltyp D-Isolat aus einem Schwein identifiziert. Das als HgbA (**H**ämoglobin-**b**indend) bezeichnete Protein ist ein spezifischer Rezeptor zur direk-

ten Bindung von Hämoglobin und vermittelt außerdem die Internalisierung von Eisen oder einer Hämingruppe in die Bakterienzelle. Über die Anwendung der IVET konnte gezeigt werden, dass die eisenregulierte Expression der transkriptionalen Einheit von *hgbA* innerhalb von zwei Stunden nach einer intraperitonealen Inokulation von Mäusen gesteigert wurde. In einer tierexperimentellen Studie unterschied sich die Fähigkeit einer *P. multocida hgbA*-Mutante zur Hämoglobin-Bindung lediglich in der Adsorptionskinetik, nicht aber in der Quantität gegenüber dem Wildtyp. Dies legte den Schluss nahe, dass *P. multocida* genau wie *H. influenzae* weitere funktionelle Hämoglobin-Rezeptor-Proteine besitzt [24].

So wurde beispielsweise bei aviären *P. multocida*-Isolaten, die offensichtlich keine Transferin-Rezeptoren haben, ein Hämoglobin-bindendes Protein mit einem MG von 113,5 kDa identifiziert. Das 2.991 bp große Gen *hgbB* ist im Gegensatz zu anderen *Pasteurella*-Eisenakquirierungssystemen zwar TonB-abhängig, aber nicht Fur-reguliert. HgbB weist in seiner AS-Sequenz eine große Ähnlichkeit (61-68 %) zu den bei *H. influenzae* charakterisierten Hb-bindenden Proteinen HgbABC auf. Im Gegensatz zu *H. influenzae* besitzen *hgbA* und *hgbB* von *P. multocida* keine Tandem-Regionen, die auf der Grundlage einer Phasenvariation eine Evasion der Wirtsimmunantwort bewirken würden [65, 114, 218].

Weder die Mutation von *hgbA* noch die von *hgbB* hatten einen Einfluss auf die Virulenz für Mäuse. Ebenso wenig vermittelte die Vakzinierung von Mäusen mit rekombinantem HgbA oder HgbB einen homologen oder heterologen Infektionsschutz, obwohl sich HgbB aufgrund seiner Lokalisation in der äußeren Membran als potentiell Impfantigen anbot [24, 65, 114].

Für *P. multocida* scheint die Akquirierung von Hämin ein wichtiger Mechanismus für seine Proliferation im Wirt darzustellen, da der Mikroorganismus mindestens zwei Hämin-bindende Proteine exprimiert und sich zudem unter anaeroben Bedingungen über die Lyse von Erythrozyten Zugang zu Hämin verschafft [65].

2.2.4.6 Lipoproteine

Lipoproteine sind bei Bakterien vor allem als funktionelle Bestandteile der Membran von Bedeutung. Bei einem *P. multocida*-Geflügel-Cholera-Isolat wurden mit Hilfe der IVET zwei Lipoproteine identifiziert, deren AS-Sequenzen 88 bzw. 78 % Ähnlichkeit zu denen zweier Membran-Lipoproteine von *H. influenzae* haben. Die Identifizierung von *in vivo* exprimierten putativen Membranproteinen indiziert möglicherweise eine Veränderung der bakteriellen Oberflächeneigenschaften, die dem Mikroorganismus während einer Infektion

einen Selektionsvorteil bietet. Das bei *P. multocida* entsprechend der Bezeichnung bei *H. influenzae* auch als PCP (**P**eptidoglykan-assoziertes **L**ipoprotein (PAL), **k**reuzreagierendes **P**rotein) bezeichnete Lipoprotein ist bei nicht-typisierbaren *H. influenzae* antigenetisch konserviert und verspricht dort ein effektives Target für die Herstellung einer rekombinanten Subunit-Vakzine zu sein.

Im Rahmen der gleichen Studie wurde außerdem festgestellt, dass *P. multocida* ein Homolog zu Protein D von *H. influenzae* *in vivo* exprimiert. Das 42-kDa große oberflächenexponierte Protein D (*hpd*) vermittelt bei *H. influenzae*-Isolaten die Bindung an Immunglobulin D und stellt insofern eine Form der Immunevasion der Bakterien dar. Es verursacht außerdem Schäden an ziliaren Epithelzellen in einem Zellkultur-Modell mit nasopharyngealen Gewebe und vermittelt eine Protektion gegen heterologe virulente *H. influenzae*-Stämme bei Ratten. Eine *H. influenzae* *hpd*-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp 100mal weniger virulent bei einer experimentell induzierten Otitis media bei Ratten. Die Identifizierung eines *P. multocida*-Homologs von Protein D mit der Bezeichnung GlpQ (**G**lycerophosphodiester **P**hosphodiesterase) *in vivo* lässt vermuten, dass dies eine ähnliche Rolle für die Immunität und Virulenz spielt. Sowohl Anti-PCP- als auch Anti-Protein D-Sera vermittelten eine bakterizide Aktivität gegen heterologe *H. influenzae*-Stämme. Mit rekombinanten Proteinen der *P. multocida*-Homologe GlpQ und PCP konnte dagegen keine protektive Immunität bei Mäusen und Hühnern ausgelöst werden, obwohl diese hohe Antikörper-Titer hatten. GlpQ wird eine pathogenetische Rolle zugesprochen, indem es durch seine enzymatische Aktivität dem Mikroorganismus Phospholipide mukosaler Sekrete als Nahrungsquelle zur Verfügung stellt und so dessen Vermehrung im mukösen Layer unterstützt [143, 190].

Ein weiteres *P. multocida* Lipoprotein ist das 40 kDa große Plp-40, das insbesondere von Kapseltyp A-Stämmen exprimiert wird. Die Menge des produzierten Plp-40-Proteins, das für die feste Verankerung des Kapselmaterials an die Zelloberfläche verantwortlich zu sein scheint, variiert im Verhältnis zur Kapseldicke und ist stark vermindert bzw. nicht präsent bei wenig bekapselten bis unbekapselten Stämmen. Plp-40 könnte als Lipoprotein den Weg für klassische nichtpolare Antiinfektiva bei der Bekämpfung von *P. multocida*-Infektionen freimachen, die sonst aufgrund der auf der Zell-Oberflächen-Physiologie des Mikroorganismus basierenden Permeabilitäts-Eigenschaften unwirksam wären [43, 283].

Das 39 kDa große *Pasteurella* Lipoprotein B (PlpB) wurde unlängst bei einem *P. multocida* Geflügel-Isolat identifiziert. Die Klonierung und Expression von PlpB wird in

der Zukunft zeigen, ob es ähnliche pathogenetische und protektive Eigenschaften besitzt wie beispielsweise das Lipoprotein PlpE bei *M. haemolytica* [241, 306].

2.2.4.7 Dermonekrotoxin (*Pasteurella multocida* Toxin)

P. multocida-Stämme des Kapseltyps D und seltener A produzieren ein antigenetisch und strukturell ähnliches, als **Dermonekrotoxin** (DNT) oder ***Pasteurella multocida* Toxin** (PMT) bezeichnetes Protein. Dieses Toxin hat bereits im Nanogrammbereich eine letale Wirkung auf Nagetiere und Vögel, ist ein potentes Mitogen für viele Zelltypen, bewirkt Zytoskelettveränderungen *in vitro* und induziert experimentell bei allen bisher untersuchten Wirtsspezies eine osteoklastische Knochenresorption. Nach intradermaler Injektion ruft das PMT bei Meerschweinchen Hämorrhagien und Nekrosen der Haut hervor [38, 56, 146].

Die größte Bedeutung kommt dem Toxin als primärer ätiologischer Faktor bei der Entstehung der **Progressiven Atrophischen Rhinitis** (PAR) beim Schwein zu. Darüberhinaus spielt es eine noch nicht vollständig geklärte pathogenetische Rolle bei der Bronchopneumonie bei Schwein und Rind und steht im Zusammenhang mit einer experimentell hervorgerufenen Proliferation des porcinen Blasenepithels [78, 99, 139, 287].

Die von toxinogenen *P. multocida*-Stämmen hervorgerufene PAR ist eine Erkrankung des ORT drei Wochen bis sieben Monate alter Schweine, die charakterisiert ist durch Atrophien und Degenerationen von Knochen- und Knorpelstrukturen der oberen Luftwege, insbesondere der Nasenmuschel und des Nasenseptums sowie der Oberkieferknochen, die in besonders schweren Fällen in sichtbaren Verkürzungen und asymmetrischen Verschiebungen der Schnauze resultieren. Diese progressive Erkrankungsform wird entweder durch *P. multocida*-Kapseltyp D- bzw. A-Stämme allein hervorgerufen oder ist mit einer *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica*-Infektion vergesellschaftet [56, 287]. *B. bronchiseptica* scheint dabei *P. multocida* die Kolonisierung des ORT mittels der Wirkung des trachealen Zytotoxins, das u.a. eine Ziliostase des Tracheal-Epithels mit einhergehender Ansammlung von Schleim bewirkt, zu erleichtern [94, 153]. Auch *B. bronchiseptica* produziert ein DNT und kann seinerseits die als **Atrophische Rhinitis** (AR) bezeichnete moderate bis milde, reversible Form der Erkrankung auslösen. Zur Abgrenzung gegen das *B. bronchiseptica*-DNT soll im Folgenden die von vielen Autoren vorgeschlagene Bezeichnung PMT für das *P. multocida* Toxin verwendet werden.

Im Gegensatz zur PAR dominieren bei pneumonischen Geschehen in Schweinebeständen laut einer klinischen Studie die in unterschiedlichem Ausmaß Toxin-produzierenden Kapseltyp A-Isolate (87,5 %) vor D-Stämmen (12,5 %) [249]. Während mit 80 % ein Großteil der D-Stämme eine PMT-Produktion aufwies, war dies lediglich bei 18,2 % der A-Stämme der Fall. In einem Infektionsversuch mit Kaninchen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen appliziertem Proteintoxin und nachfolgender Lungenveränderung aufgezeigt werden. Dadurch wurde die pathogenetische Rolle von PMT auch für Erkrankungen des tieferen RT untermauert [49].

Isoliert wurden toxinogene *P. multocida*-Stämme nicht nur vom Schwein, sondern auch von Kaninchen [86], Ziegen [12], Geflügel [269], Rindern [159], Katzen und Hunden [232] sowie von Menschen [90]. Mit Ausnahme von Mensch und Geflügel zeigten sich charakteristische Symptome einer PAR. In verschiedenen Studien zur Überprüfung des Vorkommens von PMT bei anderen *P. species* bzw. *P. multocida*-Subspezies stellte sich heraus, dass die Produktion des Toxins auf *P. multocida ssp. multocida* Kapseltyp D- und A-Stämme beschränkt ist, wobei bis dato keine genotypischen Untersuchungen dazu vorliegen [96, 232].

PMT ist ein lösliches, hitzelabiles, monomeres Protein mit einem MG von 146 kDa [319]. Die kodierende Genregion wurde erstmals 1989 von Petersen und Foged kloniert und das rekombinante Protein in *E. coli* exprimiert. Die Sequenzierung des PMT-kodierenden Gens *tox A* erfolgte 1990 gleichzeitig durch verschiedene Arbeitsgruppen [39, 181, 247]. Das chromosomal gelegene Gen ist 3.858 bp groß und kodiert für ein Protein mit 1.285 AS. Die Primärstruktur des N-Terminus von PMT weist mit 24 % bzw. 27 % Identität eine Ähnlichkeit zum N-Terminus der cytotoxischen nekrotisierenden Faktoren CNF-1 bzw. CNF-2 von *E. coli* auf, die als Deamidasen auf Rho-Proteine wirken [38, 186, 240]. Der Bereich der Homologie umspannt bei den CNFs und beim PMT eine putative Transmembran-Domäne mit hydrophoben und amphipathischen Helices, während das C-terminale Ende der PMT-Sequenz eine üblicherweise in katalytischen Domänen gefundene gemischte alpha/beta-Domäne ist [263]. Bei CNF-1 ist bekannt, dass der N-Terminus Domänen für die Bindung und Internalisierung des Toxins enthält [186]. Der C-Terminus von CNF ist dem C-Terminus des *B. bronchiseptica* DNT homolog. In beiden Toxinen vermittelt diese Region die katalytische Aktivität [160, 186, 261]. Auch PMT unterliegt auf seinem Weg zur Zielzelle den für intrazellulär aktiven AB-Toxinen typischen pH-abhängigen Konformationsänderungen [296]. Eine Analyse der funktionellen Domänen von PMT ergab in zwei unabhängigen Studien, dass der

C-Terminus wie bei den CNFs von *E. coli* und dem DNT von *B. bronchiseptica* die katalytisch aktive Domäne mit mitogenem Potential darstellt und der oberflächlich gelegene N-Terminus die Domäne für die Bindung an die Zelle und die Aufnahme des Toxins ist [38, 263].

Das *Pasteurella multocida* Toxin wird offensichtlich vom Genom eines induzierbaren Prophagen mit einer Größe von ca. 45-50 kb kodiert. Der im Gegensatz zum *P. multocida*-Genom niedrige G+C-Gehalt von 35 % versus 41 % gab einen ersten Hinweis darauf, dass *tox A* horizontal erworben wurde. Zwei der insgesamt drei untersuchten *P. multocida*-Prophagen waren integriert in tRNS-Loci, außerdem wurde die Toxin-Produktion durch die Zugabe von Mitomycin C, einer Substanz, die den lytischen Zyklus vieler temporärer Bakteriophagen induziert, erhöht [262].

PMT ist *in vivo* in Fibro- und Osteoblasten intrazellulär aktiv und bewirkt durch die Beeinflussung einer Wirtszell-Signalkaskade Veränderungen des Zytoskeletts, die sich in der Bildung von Aktin-Stressfasern und fokalen Adhäsionen an Swiss 3T3-Zellen äußern. Diese Vorgänge werden durch eine Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Rho und dessen Effektor p160/ROCK hervorgerufen [93, 175, 308]. Das Toxin stimuliert zudem ein mit einer ungebremsen DNS-Synthese einhergehendes Zellwachstum und führt damit zur Ausbildung eines malignen Phänotyps bei Rat-1 Fibroblasten-Zellen [131]. PMT induziert diese Effekte, indem es auf die freie, monomere alpha-Untereinheit heterotrimer G-Proteine der G_{q/11}-Familie als direktes Target einwirkt. Dadurch wird eine Phospholipase C zur Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositol 4,5-Biphosphat in Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) stimuliert. Die Freisetzung der gebildeten sekundären Botenstoffe führt zur Mobilisierung des intrazellulären Ca²⁺-Pools und führt zu einer Proteinkinase C-abhängigen Phosphorylierung von Proteinen [328, 337].

Verschiedene *in vitro*-Studien belegen, dass PMT konstitutiv exprimiert wird und nur in geringem Maße einer transkriptionalen Regulation unterliegt [138, 246]. Aufgrund der konstitutiven Expression von *tox A* ist der genotypische Nachweis von hohem diagnostischen Wert [188]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Rhinitis atrophicans gemäß aktuellem Tierseuchengesetz der Meldepflicht unterliegt und der Nachweis von *tox A* in Kombination mit der klinischen Symptomatik beim Schwein die Einleitung von Bestandssanierungsmaßnahmen notwendig macht.

Die von Kamp et al. (1996) beschriebene PCR scheint derzeit die sensitivste und effektivste diagnostische Methode für large-scale-Analysen von Nasen- und Tonsillar-Tupfern zu sein. Für kleinere Studien wird die Methode von Lichtensteiger et al. (1996) empfohlen, obwohl falsch positive Resultate beschrieben wurden. Beispielsweise hatte man positive Amplifikate bei Isolaten, die sowohl im ELISA als auch in der Zellkultur Toxin-negativ waren, möglicherweise zurückzuführen auf die unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen Testmethoden [5, 158, 188].

2.2.4.8 Neuraminidase

Die Funktion und Verbreitung Sialinsäure-spaltender Enzyme sowie ihrer Substrate wurde bereits ausführlich im Kapitel 2.1.4.8 beschrieben. Straus et al. (1996) konnten bei sämtlichen somatischen Serotypen von *P. multocida* eine Neuraminidaseaktivität nachweisen. Bis auf wenige Ausnahmen wiesen die Enzyme eine ähnliche Substratspezifität auf mit der höchsten Aktivität gegen N-Acetylneuramin-Laktose und absteigender Effizienz gegenüber einem humanen Glykoprotein, dem bovinen Sialoglykoprotein Fetuin, der Colominsäure und bovinem Serumalbumin. Die antigenetisch hohe Ähnlichkeit wurde durch die Neutralisierung der Neuraminidasen verschiedener Serotypen mittels spezifischer anti-*P. multocida*-Serotyp 3-Neuraminidase-Antikörper demonstriert [301].

Angaben bezüglich des MGs von *P. multocida*-Sialidasen divergieren in der Literatur erheblich und liegen zwischen 36 und 500 kDa [147, 301, 323]. Dies deutet, ungeachtet unterschiedlich angewandter Aufreinigungsmethoden darauf hin, dass ein Stamm mehrere Neuraminidasen gleichzeitig produzieren kann. Tatsächlich wurden in einem *P. multocida*-Geflügelcholera-Isolat des Serotyps 3,4 zwei unterschiedliche Sialidasegene identifiziert. Das erste, 2.180bp große Gen *nanH* kodiert für eine sogenannte "kleine" Sialidase mit einem MG von 80 kDa [214]. Ein zweites, als *nanB* bezeichnetes Gen ist 3.120 bp groß und kodiert ein zur Gruppe der "großen" Sialidasen gehörendes 120 kDa großes Protein. Die beiden beschriebenen Sialidasen unterscheiden sich nicht nur bezüglich der DNS-Sequenz ihrer Gene sondern auch in ihrer Substratspezifität gegenüber unterschiedlich verknüpften Sialoyl-Laktose-Molekülen. Sowohl NanH als auch NanB weisen eine hohe Effizienz über einen weiten pH-Toleranzbereich (pH 4,0 - 9,0) auf. Dadurch können sie in verschiedenartigen Wirtsumgebungen, wie mukösen Sekreten und Serum, eine optimale Funktionalität entfalten.

Die N-terminale Sequenz von NanH enthält eine 400 AS große Region mit etwa 50 % Ähnlichkeit zu einer *S. Typhimurium* Sialidase und den kleinen clostridialen Sialidasen. Der N-Terminus von NanB weist in einem Bereich von ca. 500 AS eine Ähnlichkeit von ca. 50 % zu *Streptococcus pneumoniae* NanA und den grossen clostridialen Sialidase-Proteinen, aber eine nur 20 %ige Ähnlichkeit zu *P. multocida* NanH auf. Beide AS-Sequenzen enthalten im N-terminalen Bereich putative Signal-Peptid-Domänen für eine Translokation durch die innere Membran [214]. Während die C-terminale Hälfte von NanH lediglich einige Sequenzcharakteristika der zur Familie der Autotransporter gehörenden Proteine aufweist, zeigt die AS-Sequenz von NanB eine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Vertretern dieser Gruppe, wie dem Temperatur-sensitiven Hämagglutinin von aviären pathogenen *E. coli* oder der Immunglobulin A-Protease von *H. influenzae* [92, 258]. Proteinen der Autotransporter-Familie ist gemein, dass sie in der Lage sind, durch eine spontane Insertion ihres Carboxy-Terminus in die Membran die Bildung einer definiert strukturierten Pore zu bewirken und sich dadurch durch die äußere Membran zu transportieren [130, 198]. Für die Translokation zusätzlich benötigte Mediatoren konnten für NanB nicht nachgewiesen werden [214].

Die Expression von zwei Sialidasen durch einen *P. multocida*-Stamm und die hohe pH-Toleranz der Enzyme erhöht die Fähigkeit des Mikroorganismus zur Freisetzung von Sialinsäure aus einer Vielfalt organischer Quellen und schafft somit eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung in verschiedenen Wirtsorganismen bzw. deren Geweben [214].

2.2.4.9 Superoxid-Dismutase

Superoxid-Dismutasen (SOD) schützen Bakterien während eines respiratorischen Bursts in Phagozyten durch den Abbau hoch toxischer Sauerstoff-Radikale, die an Geweboberflächen und der Schleimhaut während der Kolonisation gebildet werden, und tragen somit zu einem erhöhten pathogenen Potential bakterieller Erreger bei [15, 40, 171, 172].

Im Rahmen des *Pasteurella*-Genomprojektes wurden DNS-Sequenzen mit entsprechenden offenen Leserahmen identifiziert, die auf der Grundlage von Sequenzvergleichen aus internationalen Datenbanken als *sodA* und *sodC* bezeichnet wurden [211]. Untersuchungen zur Prävalenz dieser Gene bei *P. multocida* bzw. zur pathogenetischen Rolle ihrer Genprodukte bei *P. multocida*-Infektionen liegen bislang nicht vor. Es können jedoch Rückschlüsse aus der Funktion von SODs bei anderen Lungen-pathogenen Mikroorganismen gezogen werden, bei

denen oxidativer Stress aufgrund einer erhöhten Sauerstoffspannung im Lungengewebe immer eine bedeutende Rolle spielt. Die Hauptfunktion von SODs bzw. ihrer enzymatischen Produkte liegt bei respiratorischen Pathogenen wie *P. multocida* in einer Zerstörung ziliarer Strukturen mit nachfolgender Beeinträchtigung der mukoziliaren Clearance, resultierend in einem leichteren Eindringen des Erregers in das respiratorische Gewebe des Wirtes [168].

2.2.4.10 Immunglobulin-Protease

Immunglobulin-Proteasen, deren Funktion im Kap. 2.1.4.11 beschrieben wurde, verstärken bei zahlreichen bakteriellen Infektionserregern durch die Spaltung und damit Eliminierung lokaler, Adhärenz-blockierender Antikörper die Kolonisierung an Wirtsgewebe [228].

Pouedras et al. (1992) isolierten zwei *P. multocida*-Stämme von Menschen mit Lungen- und Genitalinfektionen, die eine Protease produzierten, die nicht nur humanes IgA1, sondern auch humanes IgG und humane Myeloma IgA1 und IgA2 spalteten. Für humane IgA1-Proteasen gilt, dass diese IgA1 in Fab-alpha und Fc-alpha-Fragmente spalten. Dabei behalten die Fab-Fragmente ihre volle Antigen-bindende Kapazität, aber, da sie monovalent sind, können sie keine Agglutination induzieren und sind daher ineffektiv bei der Inhibierung der bakteriellen Adhäsion. Darüber hinaus schützen alle an Oberflächen-Epitope gebundene Fab-Fragmente das Bakterium vor dem Immunsystem durch Blockierung des Zugangs von Ak-Molekülen des gleichen oder anderer Isotypen und von immunkompetenten Zellen, d.h. es kommt zu einer Maskierung des Bakteriums, der sogenannten Fabulation [165].

Negreta-Abascal et al. (1999) untersuchten fünf *P. multocida*-Stämme unterschiedlicher tierartlicher Herkunft auf ihre Protease-Sekretion hin. Alle Isolate produzierten neutrale Metalloproteasen unterschiedlichen MGs mit einer optimalen enzymatischen Aktivität zwischen pH 6 und 7, gehemmt durch chelatierende Agentien, aber nicht durch andere Protease-Inhibitoren und reaktiviert durch Calcium. Die über polyklonales Antiserum gegen eine *A. pleuropneumoniae*-Protease detektierten Proteasen waren in der Lage, Immunglobulin G zu degradieren. Die Autoren schlossen, dass die Protease-Produktion eine bedeutende Rolle während der Gewebekolonisierung bei *P. multocida*-Infektionen spielen könnte [228].

Zusammenfassung

Die hier besprochenen Literaturdaten fassen den derzeitigen Kenntnisstand zu taxonomischer Klassifizierung, Virulenzdeterminanten und Pathogenesemechanismen von *P. multocida* ssp. und –spp. zusammen. Obwohl insbesondere im vergangenen Jahrzehnt ein erheblicher Forschungsaufwand zur Pathogenese von *Pasteurella*-Infektionen sowie der Grundlage der Wirtsspezifität des Bakteriums unternommen wurden, können noch immer keine vollständigen Pathogenesemodelle entwickelt werden. Die Identifizierung neuer potentiell virulenzassoziierter Faktoren und vor allem die Entschlüsselung des *P. multocida*-Genoms lieferten zahlreiche neue Daten, die in Zukunft nicht nur als Grundlage für Transkriptom- und Proteom-Analysen verwendet werden können, sondern auch ausgedehnte molekulare epidemiologische Studien, die im Rahmen des experimentellen Teils dieser Arbeit durchgeführt wurden, ermöglicht haben.