

6. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden 45 klinische Isolate β -hämolyzierender C-Streptokokken vom Pferd auf ihr Plasmaproteibindungsverhalten untersucht, wobei die Fibronektinbindung besondere Berücksichtigung fand, indem ihre Spezifität und ihre mögliche Bedeutung für die Adhärenz von Streptokokken an Epithelzellen näher untersucht wurde.

Von den 45 klinischen Isolaten konnten 31 als S.zooepidemicus, zehn als S.equi und vier als S.equisimilis identifiziert werden.

Die Isolate wurden mit sechs affinitätschromatographisch gereinigten und ¹²⁵J-markierten Wirtsproteinen in Bindungsversuchen getestet, wobei alle Stämme mehrere Plasmaproteine banden. Die Bindungen der Proteine waren z. T. sehr stark und schwankten erheblich zwischen den einzelnen Isolaten. Für Albumin traten dabei prozentuale Bindungsaktivitäten im Bereich von 44-79%, für IgG 4-90%, für Fibronektin 6-57%, für Fibrinogen 2-98%, für α 2M 8-50% und für S-Protein 5-72% auf. Starke oder schwache Bindungen bestimmter Plasmaproteine korrelierten dabei nicht. Es wurde keine typische Verteilung der Bindungen bei den einzelnen Streptokokkenspezies festgestellt. Unmarkiertes Fibronektin hemmte die Bindung der Streptokokken an markiertes Fibronektin konzentrationsabhängig. Unmarkiertes IgG dagegen vermochte nur bei einem Isolat mit ausgeprägter Affinität für IgG die Bindung von Fibronektin zu hemmen.

Bei der Darstellung des Fibronektinrezeptors konnte bei einigen Isolaten eine Abgabe desselben in den Kulturüberstand nachgewiesen werden, welche jedoch in keinem Bezug zum Fibronektinbindungsvermögen des jeweiligen Isolates stand.

Es gelang daraufhin, aus dem Kulturüberstand eines ausgewählten Isolates ein Fibronektinrezeptorprotein affinitätschromatographisch zu reinigen. In acht Isolierungen konnten jedoch nur 500 μ g Rezeptorprotein gewonnen werden.

Für eine Antikörpergewinnung auf direktem Wege erwies sich diese Menge als nicht ausreichend, so daß außerdem mit einem gut- und einem schlecht-Fibronektin-bindenden Stamm immunisiert wurde. Es konnten hierbei zwar Antikörper gegen Fibronektinrezeptorprotein und andere Oberflächenkomponenten von Streptokokken gewonnen werden, doch ließen sich Fc-Bindungen trotz Absättigung mit IgG oder F_{ab} -Spaltung der Antiseren nicht eliminieren, ohne die Bindung des Fibronektinrezeptors zu beeinträchtigen.

In den Adhärenzversuchen konnten durch Verwendung kultivierter Zellen standardisierte Bedingungen geschaffen werden, unter denen der Einfluß der Fibronektinbindung auf die Anheftung der Isolate untersucht wurde. So führte eine Behandlung der Epithelzellen mit Fibronektin zwar zu keiner Steigerung der Anheftung, die Behandlung der Streptokokken mit Fibronektin steigerte dagegen deutlich die Anheftung.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß bei einer repräsentativen Zahl klinischer Isolate von C-Streptokokken Bindungsaktivitäten für verschiedene Plasmaproteine auftreten und daß insbesondere die Fibronektinbindung wahrscheinlich an der Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen beteiligt ist.

7. Summary:

D. Schulz:

Bindings of β -hemolytic C-streptococci from horse to hostproteins in special consideration of fibronectin.

In the present study, 45 β -hemolytic group C streptococci isolated from horse infections were studied in terms of their binding activities for several plasma proteins. Streptococcal binding to the adhesive plasma protein fibronectin was analyzed in detail by evaluating its specificity and its possible role in adherence of group C streptococci to epithelial cells.

Among the 45 clinical isolates, 31 were identified as Streptococcus zooepidemicus, 10 as S.equi and 4 as S.equisimilis.

The isolates were tested in binding assays with 125 Iodine-labelled host proteins which had been purified from horse plasma by affinity chromatography. All isolates bound several of the plasma proteins tested. Binding activities for some of these proteins were very strong and varied very strong among different isolates. Binding activities for albumin ranged from 44 to 79%, those for IgG from 4 to 90%, those for fibronectin from 6 to 57%, those for fibrinogen from 4 to %, those for α_2 macroglobulin from 8 to 50% and those for S-protein from 5 to 72%. there was no characteristic binding of certain proteins and no correlation concerning the extent of binding among different isolates or streptococcal species. Binding of fibronectin was found to be specific since only unlabelled fibronectin inhibited the binding in a dose dependent manner, although one isolate with strong IgG binding capacities showed a reduced fibronectin binding also in presence of unlabelled IgG.

In an attempt to isolate fibronectin binding components from streptococci, it was found that some isolates released fibronectin binding proteins into the culture supernatant. The extent of release, however, did correlate with the fibronectin binding activities of the respective isolate. The fibronectin binding protein of one selected isolate was purified from the culture spermatant by affinity chromatography on fibronectin coupled to sepharose®. However, the yield of 8 large scale purifications was very low (500 μ g) and turned out not to be sufficient for subsequent production of specific polyclonal antibodies. Thus, antibodies were also produced against two isolates, one of which had very significant fibronectin binding activities and another isolate with no affinity for fibronectin. The purpose of producing these antibodies was their use for cross-

absorptions to get either specific antibodies against fibronectin binding proteins or to purify fibronectin binding proteins more effectively. Antibodies against fibronectin binding proteins could be obtained but the attempts to remove the strong non-specific binding of IgG by pre-saturation or cleavage of the antibodies into F_{ab} -fragments failed.

Finally, an adherence assay with cultured epithelial cells was standardized which allowed analysis of the role of fibronectin binding in streptococcal adherence. It was found that pre-incubation of streptococci with purified fibronectin significantly increased their adherence to epithelial cells, whereas same treatment of epithelial cells did not affect streptococcal adherence.

The results of this study allow the conclusion, that the capability to bind host plasma proteins is a significant feature of equine group C streptococci as demonstrated by using a representative number of fresh clinical isolates. Furthermore, it was shown that binding to fibronectin plays an important role in adherence of these streptococci to epithelial cells.