

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die keratinolytischen Eigenschaften der Dermatophyten *Trichophyton equinum* und *Microsporum equinum* untersucht. Beide Dermatophyten sind die wichtigsten Erreger von Dermatophytosen des Pferdes. Konzentrierten sich die bisherigen Arbeiten der Keratinasenforschung vor allem auf die Dermatophyten *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* und *Microsporum canis*, so sollte diese Arbeit erste Eindrücke vom Charakter der keratinolytischen Eigenschaften der Dermatophyten *Trichophyton equinum* und *Microsporum equinum* geben.

Es kamen insgesamt 24 Stämme der Arten *Trichophyton equinum* (15) und *Microsporum equinum* (9) zur Untersuchung, die von hautkranken Pferden isoliert worden waren. Mit ihnen wurden Flüssigkulturen in einem Mineralmangelmedium mit Keratin als alleiniger Nährstoffquelle angelegt und diese anschließend auf die Sekretion von Keratinasen untersucht.

Die Literatur beschreibt nur Fälle, in denen ein Dermatophytenwachstum im Mineralmangelmedium problemlos funktionierte. In der vorliegenden Arbeit waren umfangreiche Vorversuche notwendig, um die untersuchten Dermatophyten zunächst einmal an das Mineralmangelmedium zu adaptieren und das in der Keratinasenforschung allgemein anerkannte photometrische Nachweisverfahren anwenden zu können. Zum Nachweis extrazellulärer, keratinolytischer Proteasen wurde der Keratinasenachweis von YU et al. (1968) bzw. SIESENOP (1993) eingesetzt. Dieser indirekte, photometrische Keratinasenachweis wurde durch die Anwesenheit von Nikotinsäure, einem für *Trichophyton equinum* essentiellen Wachstumsfaktor, verhindert. Mit der Gelfiltration konnte ein Verfahren eingesetzt werden, das die Nikotinsäure zuverlässig und für die Keratinasen schonend entfernt. In Verlaufsuntersuchungen über 28 Tage erfolgte die Untersuchung des Keratinase-

sekretionsverhaltens. Inklusiv aller Vorversuche zur Optimierung des photometrischen Nachweisverfahrens wurden an über 1000 Proben photometrische Messungen durchgeführt. In diesen Messungen von insgesamt 46 Ansätzen war für *Trichophyton equinum* in 45 von 286 Proben und für *Microsporium equinum* in 12 von 175 Proben eine keratinolytische Aktivität im Kulturüberstand meßbar. Der photometrische Nachweis einer extrazellulären Keratinaseaktivität gelang somit für beide Dermatophyten nur sporadisch. Außerdem war der Nachweis nicht reproduzierbar. Mittels Elektrophorese ließen sich Keratinasen in den Kulturüberständen nicht darstellen. Ergänzend wurden als weitere Untersuchungen zur Proteolysefähigkeit von *Trichophyton equinum* und *Microsporium equinum* der Keratinplattentest nach WAWRZKIEWICZ (1987, 1991), die Amidoschwarzfärbung nach STAIB (1964), der Keratinasenachweis mit azurblau gefärbter Schafwolle sowie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Der erwähnte sporadische Nachweis keratinolytischer Aktivitäten in den Kulturüberständen und die Ergebnisse der ergänzenden Untersuchungen ließen die Existenz zellwandgebundener Keratinasen vermuten. Daraufhin wurde erfolgreich versucht, eine Methode zum Nachweis und zur Darstellung zellwandgebundener Keratinasen zu etablieren: Im Überstand der Kulturhomogenisate von *Trichophyton equinum* und *Microsporium equinum* war regelmäßig eine zellwandgebundene Keratinaseaktivität photometrisch nachweisbar. Die elektrophoretische Darstellung dieser Überstände wies für beide Gattungen ein einheitliches Proteinmuster auf. Die Proteine im Überstand der Kulturhomogenisate wurden einer präparativen Elektrophorese unterzogen.

Anschließende Verdauungsversuche mit den aufgetrennten Proteinen erbrachten Hinweise auf Keratinasen in einzelnen proteinhaltigen Fraktionen der präparativen Elektrophorese. Die drei untersuchten *Trichophyton equinum*-Stämme 6, 16, und 22 bildeten keratinolytische Proteine mit Molekularmassen von 25.000 Da,

20.000 Da bzw. 23.000 Da. Dagegen gelang bei den untersuchten *Microsporium equinum*-Stämmen eine Zuordnung der Keratinaseaktivität zu einzelnen Proteinen des Kulturhomogenisates nicht.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Dermatophyten *Trichophyton equinum* und *Microsporium equinum* wahrscheinlich keine extrazellulären keratinolytischen Enzyme besitzen. Für *Trichophyton equinum* wiesen Zellwandproteine keratinolytische Aktivitäten auf. Sie wurden anhand ihres Molekulargewichtes charakterisiert. Für *Microsporium equinum* gelang die Darstellung zellwandgebundener Keratinasen nicht, obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit für deren Existenz sprechen.

Summary

Gebhardt, Thomas

Isolation and demonstration of the keratinases from the dermatophytes *Trichophyton equinum* and *Microsporum equinum*.

In the thesis presented here the keratinolytic characteristics of the dermatophytes *Trichophyton equinum* and *Microsporum equinum* were examined for the first time. Both dermatophytes are the most important causative agents of equine dermatophytosis. Since the previous work in keratinase research focused mainly on the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, and *Microsporum canis* this work should give first impressions of the feature of the keratinolytic characteristics of the dermatophytes *Trichophyton equinum* and *Microsporum equinum*.

In total 24 strains of the species *Trichophyton equinum* (15) and *Microsporum equinum* (9) were examined, which were isolated from horses suffering from dermatosis. They were inoculated into liquid mineral deficiency medium with keratin as the only nutritial source and then examined for the secretion of keratinases.

Literature only describes instances in which growth of dermatophytes in mineral deficiency medium was achieved without problems. In the work presented here numerous preliminary experiments were necessary first of all to adapt the examined dermatophytes to the mineral deficiency medium and to be able to use the spectrophotometrically proof, which is generally acknowledged in keratinase research. For the proof of extracellular keratinolytic proteases the keratinase assay of YU et al. (1968) or SIESENOP (1993) was used.

This indirect spectrophotometrically keratinase assay was inhibited by the presence of nicotinic acid, an essential growth factor for *Trichophyton equinum*

Gelfiltration could be used as a method to remove nicotinic acid reliably and gentle for the keratinases.

In long term experiments over 28 days the keratinases secretion behaviour was determined. Including all preliminary experiments for optimising the spectrophotometrically assay more than 1000 samples were assayed spectrophotometrically. In these assays of a total of 46 experiments 45 out of 286 samples for *Trichophyton equinum* and 12 out of 175 samples for *Microsporium equinum* showed keratinolytic activity in the culture supernatant. Thus the photometric proof of extracellular keratinase activity for both dermatophytes was achieved only sporadically. The assay was also not reproduceable. Through electrophoresis keratinases could not be detected.

As additional examinations for the proteolytic capabilities of *Trichophyton equinum* and *Microsporium equinum* the keratine plate assay according to WAWRZKIEWICZ (1987, 1991), the amidoblack stain according to STAIB (1964), the keratinase assay with azurblue stained sheepwool as well as fluorescence microscopical examinations were performed.

The above mentioned sporadic proof of keratinolytic activity in the culture supernatant and the results of the additional examinations allowed speculations about the existence of cell wall bound keratinases. This led to the successful establishing of a method for the isolation and purification of cell wall bound keratinases: In the supernatant of culture homogenates of *Trichophyton equinum* and *Microsporium equinum* cell wall bound keratinase activity could always be detected spectrophotometrically. Electrophoretic purification of both supernatants showed identical protein patterns for both genera. The proteins in the supernatant of culture homogenates were subjected to preparative electrophoresis. Subsequent digestion trails with the separated proteins could prove the presence of keratinases in the various protein containing fractions of the preparative electrophoresis. The 3 analysed *Trichophyton equinum* strains 6, 16, and 22 pro-

duced cell wall bound keratinases with molecular masses of 25.000 Da, 20.000 Da and 23.000 Da, respectively. In contrast, an assignment of keratinase activity to certain proteins could not be achieved for the *Microsporum equinum* strains analysed.

The present research shows that the dermatophytes *Trichophyton equinum* and *Microsporum equinum* do not exhibit extracellular keratinolytic properties. For *Trichophyton equinum* cell wall bound proteins showed keratinolytic activities. They have been characterised with respect to their molecular masses. For *Microsporum equinum* the identification of cell wall bound keratinases could not be achieved although the data from this work give indications for their existence.