

Slutrapport för projekt 0447057

Anslagsmottagare Prof. Bengt Guss, institutionen för mikrobiologi, SLU

Projekttitel:

Studier av *Streptococcus equi* i syfte att utveckla metoder för att förhindra kvarka

Bakgrund

Streptococcus equi underart *equi* och underart *zooepidemicus* är bakterier vilka orsakar olika sjukdomar hos häst. *S. equi* underart *equi* orsakar en rapportpliktig smittsam respiratorisk sjukdom kallad **kvarka**. I motsats till underart *equi* betraktas underart *zooepidemicus* som en opportunist vilken förekommer i rad olika sjukdomar hos häst. Trots att underarterna ger upphov till olika sjukdomar är de genetiskt mycket nära besläktade.

När projektet startade antog vi, baserat på tidigare erfarenhet från forskning rörande patogena streptokocker och stafylokocker, att bakterier såsom *S. equi* underart *equi* och underart *zooepidemicus* har den genetiska förmågan att uttrycka ett antal olika faktorer som påverkar bakteriernas förmåga att kolonisera och undvika värdens immunförsvar. Sammantaget anses förmågan att orsaka sjukdom bero på ett flertal extracellulära bakteriella faktorer s.k. virulensfaktorer vilka på olika sätt interagerar med värden. Bakterierna kan t.ex. på sin yta uttrycka proteiner vilka specifikt medierar bindning till enskilda lösliga proteiner hos värden eller adhesion till komplexa värdcellsstrukturer såsom till extracellulära matrix. Vidare kan bakterierna t.ex. producera lösliga toxiner eller enzymer vilka bryter ned proteiner och strukturer hos värden. För att utveckla metoder som effektivt kan förhindra en infektion, såsom kvarka, är det vår uppfattning att man måste identifiera och studera de ingående komponenterna i interaktionen mellan patogen och värd för att förstå infektionsprocessen.

Syftet med projektet var att:

- identifiera och studera potentiella virulensfaktorer, specifikt extracellulära cellytebundna och lösliga proteiner hos *Streptococcus equi* främst underart *equi*
- i olika cellbiologiska system undersöka hur dessa bakteriella proteiner interagerar med eukaryota celler
- använda de producerade rekombinanta proteinerna som antigener i immuniseringsexperiment på mus
- studera de genererade musantikropparnas förmåga att t.ex. inhibera funktionen hos de bakteriella proteinerna
- i en experimentell infektionsmodell på mus undersöka om de identifierade potentiella virulensfaktorerna kan användas som vaccinkomponenter för att skydda försöksdjur mot experimentell infektion av *S. equi* underart *equi*

Material och metoder

Bioinformatikstudier

Forskargruppen har en lång erfarenhet av att identifiera och analysera gener vilka kodar för extracellulära proteiner hos patogena streptokocker och stafylokocker. Förutsättningar för att identifiera potentiella virulensfaktorer underlättas betydligt om genomet hos den bakterie man vill undersöka finns sekvenserat och annoterat. I fallet *S. equi* underart *equi* och underart *zooepidemicus* är genomen hos båda underarterna sekvenserade och tillgängliga via Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) vilket underlättat bioinformatikstudier. Det bör påpekas att inget av genomen var och fortfarande är annoterade.

Isolering och uttryck av rekombinanta proteiner

För att isolera de identifierade generna användes PCR och för att uttrycka generna användes ett för *E. coli* utvecklat expressionssystem kallat IMPACT från New England Biolabs. Systemet är ett kombinerat expression- och proteinreningsystem vilket möjliggör att klonade gener (eller delar av) effektivt kan uttryckas och rekombinanta proteiner renas för vidare studier.

Studier av rekombinanta proteiner

De renade proteinerna analyserades med avseende på förmåga att binda till olika komponenter i häst t.ex. om de kan binda till proteiner i serum eller plasma. För att undersöka detta användes ett flertal metoder vilket beskrivs ingående i våra publicerade arbeten. Till exempel kopplades proteinerna på s.k. HiTrap-kolonner (GE Healthcare) varpå serum alternativt plasma passerades för att undersöka om bakterieproteinerna specifikt binder till någon lösligt komponent. För att mäta bindning märktes bakterieproteinerna med en radioaktiv isotop ^{125}I för att användas i t.ex. Western blot- och inhibitions-studier.

För att undersöka om hästar vilka konstaterats ha haft kvarka eller om möss vilka immuniserats med bakterieproteiner bildar antikroppar mot de studerade proteinerna utfördes olika ELISA och Western blot-studier. Sammantaget användes flera olika konventionella metoder vilka framgår av våra publikationer.

Eukaryota cellförsök

I samarbete med Prof. K. Rubin, Uppsala Universitet, undersöktes ett antal av de rekombinanta proteinerna i ett cellsystem för att analysera om proteinerna påverkar eukaryota celler, främst deras förmåga att interagera med extracellulära matrix-proteiner hos värden. Försöksuppsättningen beskrivs ingående i referenserna 6 och 7.

Immuniserings- och vaccinationsförsök på möss

I samarbete med Prof. Flock's forskargrupp vid Karolinska institutet, undersöktes om de rekombinanta proteinerna gav upphov till antikroppar vid immunisering av möss (NMRI) samt om dessa blev skyddande vid en senare experimentell luftvägsinfektion av *S. equi* underart *equi*. Mössen hade tidigare vid upprepade tillfällen (tre gånger) immuniserats intranasalt med olika rekombinanta bakterieproteiner varpå försöksdjuren intranasalt infekterades med underart *equi* (10^6 CFU). Efter infektion mättes två parametrar, nasal kolonisation av bakterier samt minskning av kroppsvikten. Av erfarenhet vet vi att dessa parametrar på ett bra sätt speglar summan av de eventuella skyddseffekter försöksdjuren får vid immunisering. Vidare är parametrarna lätta att kvantifiera och dessutom skonsamma för försöksdjuren. Alla djurförsök utfördes efter godkänd etisk prövning.

Konstruktion av mutanter

En forskargrupp vid Animal Health Trust (AHT), New Market, England, ledd av Dr. Andrew Waller, bedriver liksom vi ett molekylärbiologiskt arbete rörande *S. equi*. I Dr. Waller grupp har man satt upp en teknik för att konstruera specifika mutanter i underart *equi*. I november 06 besökte Dr. Jonas Lannergård Dr. Waller's grupp för att lära sig tekniken att göra specifika gendeletionsmutanter i *S. equi*.

Resultat

Med utgångspunkt från tidigare studier har forskargruppen erfarenhet att via bioinformatikstudier identifiera Gram-positiva extracellulära cellväggsförankrade eller lösliga proteiner. Undersökning av genomdatabasen (Sanger) resulterade i att ett antal gener vilka

teoretiskt kodar för extracellulära proteiner hos underart *equi* identifierades. Bland dessa valdes några ut för vidare analys.

Kollagenliknade proteiner (Scl-familjen)

Tidigare hade forskargruppen m.h.a phage display identifierat ett cellytebundet protein hos underart *equi* kallat SclC vilket innehåller kollagen-liknande sekvenser. Proteinets uppvisar även stora likheter i aminosyrasekvens med två tidigare publicerade cellyteproteiner hos *Streptococcus pyogenes*. Under projekttiden utfördes fortsatta bioinformatikstudier vilket visade att underart *equi* har ytterligare sex stycken gener kodande för kollagen-liknande cellyteproteiner kallade SclD-SclI (2). Jämför man proteinerna finner man att de strukturellt liknar varandra, den N-terminala signalsekvensen följs av en unik icke repetitiv region, kallad A, följt av en höggradigt repetitiv region kallad CL. CL-regionen (collagen-like region) består av ett stort antal aminosyrarepetitioner (Gly-Xaa-Yaa) vilka också förekommer i kollagen. Efter CL-regionen följer i C-terminalen en prolinrik domän vilken hypotetiskt är lokaliserad i bakteriens cellvägg. I C-terminalen återfinns också ett så kallat LPXTG-motiv följt av en membranförankrande del vilka är nödvändiga för att kovalent koppla proteinerna i bakteriecellväggen.

För att studera de sju Scl-proteinerna klonades generna samt den del som kodar för de unika A-regionerna och uttrycktes i *E. coli*. Efter rening studerades om antikroppar i bl.a. sera från hästar vilka tidigare haft kvarka reagerar med de Scl-proteinerna. Resultaten från ELISA visade att hästar vilka haft kvarka har en förhöjd IgG-titer mot alla A-regioner vilket tyder på att alla Scl-proteiner uttrycks på bakteriecellytan under en *S. equi* infektion. Resultat från ELISA visade också att affinitetsrenade antikroppar mot SclC korsreagerade med CL-regionen hos de övriga Scl-proteinerna.

Fibronektin- och kollagen-bindande extracellulära proteiner

Forskargruppen hade innan projektet startade rapporterat att underart *equi* har två gener kodande för extracellulära lösliga fibronektin-bindande proteiner (FNE och SFS). Under projekttiden studerades dessa vidare (3). Vid jämförelse av aminosyrasekvens uppvisar proteinerna ingen sekvenshomologi men binder trots detta till samma (eller närliggande) site på fibronektin. Fortsatta bioinformatikstudier visade att underart *equi* har ytterligare fem stycken gener kodande för extracellulära proteiner, kallade FNEB-FNEF, alla uppvisande stora likheter i aminosyrasekvens med FNE (5). Fyra av dessa har liksom de kollagenliknade proteinerna C-terminal sekvenser vilken uppvisar alla karakteristiska drag man finner hos cellväggsförankrade proteiner medan det femte proteinet enligt sekvensanalys bör sekretieras ut i mediet. Generna för FNEB-FNEF klonades och uttrycktes i *E. coli* och de rekombinanta proteinerna renades och deras fibronektin-bindande aktivitet studerades (5). Resultaten visade bl.a. att proteinerna trots att de uppvisar partiell sekvenshomologi varierar i fibronektin-bindande aktivitet. Vissa binder fibronektin medan andra saknar bindande aktivitet. Genom att använda renade proteasgenererade fragment av fibronektin kunde den bindande regionen för vissa av bakterieproteinerna t.ex FNEB lokaliseras till det N-terminala s.k. 29 kDa fragmentet medan andra FNE och SFS specifikt binder till ett internt 40 kDa fragment i fibronektin (3). Ett ytterligare intressant resultat var att vissa av de fibronektin-bindande proteinerna också binder till kollagen (5).

Interaktionsstudier med eukaryota celler

För att studera den biologiska funktionen hos de identifierade bakterieproteinerna inleddes ett samarbete med Prof. K. Rubins forskargrupp. Forskargruppen vid Uppsala universitet har en mycket lång erfarenhet och experimentella system för att studera extracellulär matrix hos eukaryoter. För att studera om de extracellulära bakterieproteinerna påverkar eukaryota cellers

förmåga att interagera med extracellulära matrixproteiner användes en kollagenkontraktionsmodell. Försöksmodellen kan förenklat beskrivas enligt följande: eukaryota celler (mus C2C12 myoblast celler) blandas i en kollagensuspension vilken efter inkubation bildar en gel. I normalfallet kommer cellerna under inkubationstiden att binda till kollagen och kontrahera gelen vilket kan följas och mätas mikroskopiskt. Graden av kontraktion kan redovisas som minskning av gelarean i jämförelsen med arean vid försökets start. För att studera bakterieproteinernas effekt på kontraktionen screenades en serie av olika rekombinanta proteiner. Resultaten visades att vissa proteiner (FNEB, SFS och ScIC) inte påverkade C2C12 cellernas förmåga att kontrahera kollagengelen medan FNE stimulerade kontraktionen. Vidare kunde ett av de testade proteinerna, kallat CNE, inhibera kontraktionen (6, 7).

IdeE och IdeZ, två IgG-klyvande enzymer

Bioinformatikstudierna visade att underart *equi* och underart *zooepidemicus* båda har en gen som har sekvenslikheter med en gen hos *S. pyogenes* vilken kodar för ett specifikt IgG-klyvande extracellulärt enzym kallat IdeS/Mac. IdeS/Mac klyver specifikt i den s.k. hinge regionen i IgG vilket resulterar i att antikroppen förlorar sin Fc-region. Med hjälp av PCR klonades båda dessa gener från resp. underart och de rekombinanta enzymerna kallade IdeE (från underart *equi*) och IdeZ (från underart *zooepidemicus*) uttrycktes i *E. coli* (4). Efter rening studerades den IgG-klyvande aktiviteten hos respektive enzym. Resultaten visade att både IdeE och IdeZ uppvisar liknande klyvningsaktivitet som IdeS/Mac. Studier av specificiteten i klyvningen visade att IdeE och IdeZ klyver IgG från olika djurslag med olika effektivitet t.ex. IgG från marsvin, hund och människa klyvs mer effektivt än IgG från häst. Orsaken till att IgG från häst verkar vara mer resistent mot klyvning undersöktes närmare vilket visade att i den resistenta fraktionen återfanns den dominerande subklassen i IgG-fraktionen hos häst IgG4 (> 40%). Förklaringen att denna subclass inte klyvs beror troligen på att den i det postulerade klyvningsstället i antikroppen saknar det aminosyrasekvensmotiv (LLG) som tidigare rapporterats vara kritiskt för IdeS/Mac klyvning. I den fraktion av IgG från häst som klövs av IdeE analyserades den N-terminala klyvningsprodukten m.h.a. tandem mass spectrometry sekvensering. Resultatet visade en N-terminal sekvens GPSVFIFPP[K/P]PK vilket konfirmerade att IdeE och IdeS/Mac klyver IgG vid samma site.

Uttrycket av antikroppsklyvande aktivitet hos underart *equi* och underart *zooepidemicus* studerades också i bakteriecellkulturer odlade under olika betingelser. Nedbrytning av IgG observerades när underart *equi* odlades i närvaro av hästserum men inte om enbart rent IgG tillsattes. Däremot kunde inte någon nedbrytning av IgG ses när celler av underart *zooepidemicus* odlades i närvaro av hästserum. Preliminärt har en mutant vilken saknar IdeE konstruerat av J. Lannergård men arbetet med att karakterisera denna mutant återstår.

Vaccinationsstudier

I samarbete med Prof. J.-I. Flock's forskargrupp undersöktes om ett antal av de studerade extracellulära proteinerna vid immunisering av möss kan generera ett skydd mot senare infektion av underart *equi* (1). Resultaten visade att separata immuniseringar med det kollagen-bindande proteinet CNE och det kollagen-liknande proteinet ScIC samt FNEB gav höga antikroppstitrar medan ett annat protein, kallat EAG (ett cellyteprotein från underart *equi* vilket binder alfa-2-makroglobulin, serum albumin och IgG) var svagt immunogen. Däremot erhöles högre antikroppstitrar mot EAG om proteinet immuniserades tillsammans med CNE. Resultaten från olika immuniseringsförsök följt av experimentell infektion av mössen med underart *equi* visade att vissa kombinationer av extracellulära proteiner ger en skyddseffekt. Denna effekt är mätt såsom en minskad nasal kolonisation och en minskad nedgång i kroppsvikt efter infektion. Resultaten visade också att det fanns en variation i skyddseffekten,

immunisering med enskilda proteiner gav en svag effekt och i ett fall (FNEB) ingen effekt alls, trots höga antikroppstitrar. SclC gav en bra skyddseffekt men den bästa effekten erhöles när kombinationer av proteiner användes, CNE tillsammans med EAG.

För att undersöka antikropparnas blockerade effekt användes sera från immuniserade möss. Från tidigare studier vet vi att underart *equi* vid odling under laboratorieförhållanden (i Todd-Hewitt broth) uttrycker kollagen-bindande aktivitet men ingen eller väldigt låga nivåer av EAG. Analys av sera från möss immuniserade med CNE visade att dessa antisera till ~75 % kunde blockera bakteriecellernas bindning till immobiliserat kollagen (1).

Diskussion

I projektet har vi identifierat och karakteriserat en familj av sju stycken extracellulära kollagen-liknande proteiner (Scl-familjen) hos underart *equi* vilka baserat på analysen av aminosyrasekvenserna är förankrade i cellväggen. I dagsläget vet vi inte om de specifikt binder till någon löslig komponent i hästens serum/plasma eller till någon komponent i t.ex. extracellulära matix. Genom att mäta antikroppstitrarna hos häst som drabbats av kvarka kunde vi visa att drabbade hästar har en förhöjd titer mot Scl-proteinerna vilket visar att de under en infektion uttrycks av bakterien (2). Detta är ett intressant resultat för en majoritet av hästar vilka haft en infektion orsakad av *S. equi* underart *equi* efter konvalescensperioden inte verkar drabbas av kvarka vilket i sin tur indikerar att det antikroppssvar som utvecklats under infektionen verkar skyddande. Dock bör påpekas att det är oklart hur länge denna effekt kvarstår. För att studera om rekombinanta proteiner vid immunisering av möss kunde generera ett skydd i en experimentell infektionsmodell testades SclC, CNE, EAG och FNEB separat eller i kombinationer (1). Resultaten visade att immunisering med vissa proteiner framkallar en skyddseffekt vilket är ett mycket viktigt resultat för den fortsatta utvecklingen av ett vaccin mot underart *equi* infektioner.

Som i fallet med Scl-familjen ledde bioinformatikstudier till att en ny familj av extracellulära proteiner vilka har homologi till det fibronectin-bindande proteinet FNE identifierades i underart *equi* (5). Familjen består av sex proteiner varav fyra, baserat på aminosyrasekvensanalys, verkar vara förankrade på cellytan. Efter kloning och rening mättes den fibronectin-bindande aktiviteten hos de rekombinanta proteinerna. Förvånande var att endast tre (FNE, FNEB och FNEE) band fibronectin men hos de övriga (FNEC, FNED och FNEF) kunde ingen fibronectin-bindning påvisas. Fortsatta bindningsstudier visade dock att majoriteten (FNE, FNEC, FNED, FNEE samt FNEF) av proteinerna har kollagen-bindande aktivitet. Intressant är att trots homologier i aminosyrasekvens kan proteinerna uppenbarligen sakna eller ha en ytterligare bindningsegenskap vilket visar att det inte enbart går att m.h.a. bioinformatikstudier förutsäga vilka bindningsegenskaper ett specifikt protein har. Studierna av de olika proteinernas bindningsegenskaper kommer att fortgå för att t.ex. försöka lokalisera vilka delar av proteinerna som medierar bindning och var de binder i kollagen- resp. fibronectin-proteinerna.

För att studera de rekombinanta proteinernas interaktion med eukaryota cell användes en kollagen-kontraktionsmodell (6, 7). Resultaten visade att vissa av de testade proteinerna inte hade någon påverkan medan CNE-proteinet kunde inhibera kontraktionen. Det i vårt tycke mest intressanta resultatet pekande på en ny mekanism var att FNE kunde stimulera kontraktionen genom att proteinet samtidigt kan binda både kollagen och fibronectin och att denna process är beroende av $\alpha V\beta 3$ integrinet hos C2C12 celler. Då detta integrin är involverat i att motverka ödembildning vid inflammation är det möjligt att FNE kan ha betydelse vid ödembildningen i infekterad vävnad vilket i förlängningen skulle peka på att protein såsom FNE har egenskaper som skulle påverka bakteriens virulens.

Immunoglobulin G har en nyckelroll i det immunologiska försvaret hos däggdjur. Genom att binda till invaderande bakterier kan IgG antikroppar hjälpa till att oskadliggöra bakterierna antingen genom att aktivera det klassiska komplementaktiveringssystemet eller genom opsonisering effektivisera fagocytosen. IgG antikroppar kan också som i fallet med CNE-proteinet inhibera adhesion av bakterier till värdcellskomponenter eller binda och inaktivera toxiner. I projektet identifierades och studerades två enzymer kallat IdeE och IdeZ från underart *equi* resp. underart *zooeconomicus* vilka specifikt klyver IgG antikroppar (5). Hur de påverkar bakteriernas virulens kommer att studeras i framtiden.

Övrigt

Stödet från Stiftelsen Svensk Hästforskning till det genomförda projektet omfattade stöd till driftmedel för två doktorander i forskargruppen. Lönebidrag för dessa doktorander, Åsa Karlström och Jonas Lannergård, har finansierats av SLU. Sammantaget har arbetet i projektet vilket beskrivs i rapporten varit mycket framgångsrikt och resulterat i ett flertal vetenskapliga artiklar vilka ingår i Å. Karlströms och J. Lannergårds avhandlingar.

Åsa Karlström disputerade 11 november, 2005 på en avhandling med titeln "Collagen-like proteins in horse pathogenic *Streptococcus equi*" vilken bygger på fyra publikationer alla rörande extracellulära proteiner hos *Streptococcus equi* underart *equi*. I tre av dessa artiklar tillkännages att Stiftelsen Svensk Hästforskning finansiellt har stött arbetet.

Jonas Lannergård disputerar den 27 oktober 2006 på en avhandling med titeln "Potentially virulence-related extracellular proteins of *Streptococcus equi*" vilken bygger på fyra publikationer. I två av dessa artiklar och ett manuskript tillkännages att Stiftelsen Svensk Hästforskning finansiellt har stött arbetet. Dessutom tillkännages i ett manuskript (Lidén, Å., van Wieringen, T., Lannergård, J., Karlström, Å., Guss, B. and Rubin, K. 2006) utanför avhandlingarna att Stiftelsen har stött arbetet.

Summering av artiklar och manuskript vilka tillkännager att Stiftelsen Svensk Hästforskning finansiellt har stött arbetet:

1. Flock, M., Karlström, Å., Lannergård, J., Guss, B. and Flock, J.-I. (2006) Protective effect of vaccination with recombinant proteins from *Streptococcus equi* subspecies *equi* in a stranglers model in the mouse. *Vaccine* 24:4144-4155.
2. Karlström, Å., Jacobsson, K. and Guss, B. (2006) ScIC is a member of a novel family of collagen-like proteins in *Streptococcus equi* subspecies *equi* that are recognized by antibodies against ScIC. *Vet. Microbiol.* 114:72-8.
3. Lannergård, J., Flock, M., Johansson, S., Flock, J.-I., and Guss, B. (2005) Studies of fibronectin-binding proteins in *Streptococcus equi*. *Infect. Immun.* 73:7243-7251.
4. Lannergård, J. and Guss, B. (2006) IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp *equi*. *FEMS Microbiology Letters* 262:230-235.
5. Lannergård, J. and Guss, B. (2006) FNE belongs to a novel family of fibronectin-binding and collagen-binding proteins of *Streptococcus equi* subspecies *equi* (manuskript i Jonas Lannergårds doktorsavhandling, SLU ISBN 91-576-7129-X)

6. Lidén, Å., Karlström, Å., Lannergård, J., Kalamajski, S., Guss, B., Rubin, K. And Rydén, C. (2006) A fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi* binds collagen and modulates cell-mediated collagen gel contraction. *Biochem Biophys Res Com* 340:604-610.

7. Lidén, Å., van Wieringen, T., Lannergård, J., Karlström, Å., Guss, B. and Rubin, K. (2006) Effects of streptococcal extracellular matrix-binding proteins on $\alpha V\beta 3$ -directed collagen gel contraction (manuskript i Åsa Lidén doktorsavhandling Uppsala Universitet ISBN 91-554-6485-8.)

Dessutom har resultaten från vår forskning presenterats vid en rad olika internationella konferenser i USA (två ASM möten), Storbritannien (Bioteknikkonferens) och Frankrike (Streptokock-konferens).

Samarbeten i projektet

Finansieringen har även bidragit till att vår forskargrupp har kunnat upprätthålla våra grundvetenskapliga samarbeten med Karolinska Institutet (Prof. Jan-Ingmar Flock) och Uppsala Universitet (Prof. Kristofer Rubin) vilket återspeglas i författarskapet i de olika artiklarna. Vidare har vi för avsikt att utöka vårt grundvetenskapliga samarbete med Animal Health Trust (AHT), New Market, England.

Ur näringens perspektiv har vår forskning bidragit till att vi vetenskapligt kunnat samarbeta med ett svenskt vaccinföretag (NordVacc Läkemedel AB) vilket driver ett projekt för att utveckla ett vaccin mot kvarka. Observera att inga medel från Stiftelsen har använts i detta samarbete och att detta samarbete inte försvårat eller fördröjt publiceringen av våra forskningsresultat.