

Molekylärbiologiska studier av hästpatogena streptokocker för ökad kunskap om sjukdomen kvarka

Anslagsmottagare Professor Bengt Guss
Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för mikrobiologi, Box 7025, 750 07 Uppsala

Bakgrund

Streptococcus equi underart *equi* (*S. equi*) samt underart *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) är viktiga hästpatogena bakterier. *Streptococcus equi* infekterar företrädesvis endast hästar och orsakar en allvarlig och mycket smittosam respiratorisk sjukdom kallad **kvarka** (engelska "strangles"). Sjukdomsförloppet vid kvarka inleds då bakterien infekterar slemhinnan i hästens mule, varifrån bakterierna sprider sig via det lymfatiska systemet till lymfkörtlar i hästens huvud och hals. En snabb bakteriell förökning i lymfkörtlarna leder till en massiv inflammation, feber och svullnader vilket leder till bölder som ofta brister. Den kliniska bilden av kvarka har beskrivits i flera översiktsartiklar (5, 24).

Streptococcus zooepidemicus är den mest frekvent isolerade opportunistiskt patogena bakterien hos häst. Underarten förekommer i bl. a. sårinfektioner och infektioner i luftvägarna samt kan vara involverad i reproduktionsstörningar. *Streptococcus zooepidemicus* är inte värdspecifik, utan orsakar också sjukdom hos andra djurslag t.ex. nötkreatur, gris, hund och kan även orsaka sjukdom hos människor. Genetiskt är båda underarter mycket nära besläktade. Studier av *S. equi* visar att olika isolat inom denna underart är mycket närbesläktade i motsats till *S. zooepidemicus* som uppvisar en stor stamvariation (6, 19, 21).

Vår kunskap om dessa streptokockers förmåga att framkalla sjukdom är idag bristfällig. Bakterierna har förmågan att producera ett stort antal potentiella virulensfaktorer i form av extracellulära proteiner vilka på olika sätt interagerar med värdjuret. Faktoreorna kan antingen vara förankrade i cellväggen eller transporteras ut ur cellen till den omgivande miljön. Identifiering och studier av funktionen hos virulensfaktorer är en mycket viktig del i förståelsen av infektionsprocessen. En viss grupp av virulensfaktorer har t.ex. visat sig specifikt mediera adhesion av bakteriecellen till strukturer hos värden vilket troligtvis möjliggör bakteriens kolonisation av värdjuret. Vidare kan vissa faktorer till exempel specifikt inhibera fagocytos eller på annat sätt störa värdens immunologiska försvar. Ett antal toxiner och enzymer som påverkar värdens immunsvaret har också identifierats.

Vår forskargrupp har under många år molekylärbiologiskt identifierat och studerat extracellulära potentiella virulensfaktorer hos *S. equi* (1, 2, 4-26, 28). I korthet har vi screenat *S. equi* och *S. zooepidemicus* genom med bioinformatiska verktyg för att identifiera gener kodande för potentiella virulensfaktorer. Genom att t.ex. använda publicerade protein- eller gensekvenser från olika typer av virulensfaktorer (beskrivna från andra arter patogena streptokocker och stafylokocker) som sökverktyg, har vi hittills identifierat ett antal gener kodande för extracellulära proteiner i *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Sammantaget har vi identifierat och karakteriserat 18 st olika extracellulära proteiner hos *S. equi* vilka redovisas i tabell 1.

Tabell 1.

Proteiner vilka identifierats och studerats. *Proteiner i fet stil har studerats i nuvarande projekt.*

Namn på protein i <i>S. equi</i>	Motsvarande protein i <i>S. zooepidemicus</i>	Funktion i relation till värden
CNE	CNZ	Kollagen-bindande
EAG	ZAG	α_2 M-, albumin och IgG-bindande
FNE	FNZ	Kollagen- och fibronektin-bindande
FNEB	FNZ2	Fibronektin-bindande
FNEC	-	Kollagen-bindande
FNED	-	Kollagen-bindande
FNEE	-	Kollagen- and fibronektin-bindande
FNEF	-	Kollagen-bindande
IdeE	IdeZ	IgG-endopeptidas
IdeE2	IdeZ2	IgG-endopeptidas
SclC – SclI (7st)		Okänd
SFS	SFS	Fibronektin-bindande

Genom att först teoretiskt identifiera potentiellt intressanta gener har vi m.h.a traditionell PCR-baserad kloning isolerat och uttryckt enskilda gener och karakteriserat de rekombinanta proteinerna vad avser t.ex. adhesionssegenskaper, enzymatisk aktivitet, etc. Uttrycket av proteinerna på bakterierna har även undersökts hos bakterieceller odlade *in vitro*.

Mål

Den övergripande målsättningen med projektet har varit att vidareutveckla våra molekylärbiologiska studier av virulensrelaterade extracellulära proteiner hos främst *S. equi*. Genom olika samarbeten med andra forskargrupper har vi m.h.a cell och djurförsök studerat betydelsen av de bakteriella proteinerna i interaktionsprocessen mellan patogen och värd.

Material och metoder

Bioinformatikstudier

Genomet för *S. equi* och *S. zooepidemicus* är idag sekvenserat och offentligt tillgängligt (www.sanger.ac.uk). Möjligheten att göra bioinformatiska sekvensjämförelser i genomdatabaser har markant underlättat studier av den molekylära bakgrunden till bakteriell virulens. Framförallt är möjligheten att söka efter homologi till redan kända virulensfaktorer i besläktade patogener en viktig väg för att identifiera potentiella virulensfaktorer.

Kloning av gener kodande för potentiella virulensfaktorer samt uttryck av rekombinanta proteiner

För att studera funktioner hos virulensrelaterade protein är det viktigt att bioinformatiska studier kompletteras med experimentella studier. Genom att först teoretiskt identifiera potentiellt intressanta gener har vi m.h.a PCR-baserad kloning isolerat och i *E. coli* uttryckt enskilda gener eller fragment därav. Efter affinitetsrening har de rekombinanta proteinerna

(alternativt domäner därav) karakteriserats vad avser t.ex. adhesionegenskaper och enzymatisk aktivitet.

Karakterisering av rekombinanta proteiner

För att studera protein-protein interaktioner har olika metoder använts t.ex. surface plasmon resonance m.h.a. en biosensor utrustning (Biacore) vilket analyserar proteininteraktioner i real tid. Andra metoder som använts vid karakterisering är t.ex. SDS-PAGE och Western-ligand blots. För att karakterisera enzymatisk aktivitet hos renade rekombinanta IgG-endoproteaser (alternativt odlingsmedium från *S. equi* /*S. zooepidemicus* kulturer) har renade antikroppar (alternativt serum) från olika djurslag använts. Via samarbetet med Prof. Kristofer Rubins forskargrupp vid Uppsala universitet, Prof. Dick Heinegårds forskargrupp vid Lunds universitet samt Prof. Richard W Farndale vid University of Cambridge, England har de rekombinanta proteinerna CNE och FNE karakteriserats avseende matrixbindande egenskaper.

Mastcellförsök

Professor Gunnar Pejlers forskargrupp vid SLU har under lång tid studerat mastceller. I projektet har studerats hur levande respektive döda *S. equi* påverkar mastceller hos mus.

Cellförsök kollagen-kontraktionsmodell

Professor Rubins forskargrupp har vid sina studier av extracellulära matrixproteiner satt upp en modell bestående av cellkulturer från mus för att bl. a. studera olika mekanismer som påverkar hur eukaryota celler interagerar med matrixproteiner såsom t.ex. kollagen (kollagen kontraktionsmodellen). Modellen har använts för att studera hur olika rekombinanta *S. equi* proteiner påverkar eukaryota cellers funktion.

Musförsök för att mäta hur ett rekombinant protein (FNE) påverkar det ”interstitial fluid pressure” (IFP) in vivo

Professor Rolf Reed vid universitetet i Bergen har satt upp en musmodell vilken kan användas för att bl. a. mäta hur olika komponenter påverkar ITP *in vivo*. Via samarbetet med Prof. Rubin användes denna modell för att mäta hur det rekombinanta *S. equi* proteinet FNE påverkade ITP.

S. equi mutant

Ass. Prof. Andrew Waller forskargrupp vid Animal Health Trust, Newmarket, England har satt upp ett system för att konstruera s.k. ”site specific mutants” i *S. equi*. I samarbete med Wallers grupp konstruerades en mutant vilken saknar genen kodande för FNE.

Infektionsstudier in vivo med FNE negativ mutant

I samarbete med Prof. Rubins forskargrupp studerades infektionsförloppet i mus vid en subkutan infektion av den FNE negativa mutanten.

Vaccinationsförsök på möss

Professor Jan-Ingmar Flocks forskargrupp vid Karolinska Institutet har sedan cirka 10 år tillbaka etablerat en experimentell *S. equi* – intranasal infektionsmodell på möss. ”Kvarkamodellen” på mus har visat sig fungera mycket bra och har använts i projektet för att studera om rekombinanta proteiner i olika vaccinformuleringar framkallar ett skydd vid senare *S. equi* infektion (challenge).

Resultat och diskussion

IgG-klyvande enzymer och vaccinationsförsök

Immunoglobuliner är av central betydelse i världens immunologiska försvar. Patogena streptokocker (och stafylokocker såsom *S. aureus*) är tidigare kända för att producera extracellulära proteiner vilka på olika sätt interagerar med immunoglobuliner (främst IgG). De mest kända är förmodligen protein A (25) (från *S. aureus*) och protein G (3) (från humana grupp G streptokocker) vilka specifikt binder till IgG från olika djurslag vilket stör världens komplementaktivering. Vi har tidigare studerat de protein G liknande proteinerna EAG (*S. equi*) och ZAG (*S. zooepidemicus*) vilka binder IgG på liknande sätt som protein G.

Förutom att binda till IgG kan även streptokocker såsom *Streptococcus pyogenes* producera ett protein (IdeS/Mac) vilket inaktiverar IgG genom att enzymatiskt specifikt klyva sönder IgG. Vi har tidigare rapporterat om extracellulära endoproteaser kallat IdeE från *S. equi* resp. IdeZ från *S. zooepidemicus* vilka specifikt klyver vissa subklasser av IgG hos häst (14). I nuvarande projekt visade fortsatta bioinformatikstudier att *S. equi* även kodar för ett IdeE-liknande protein kallat IdeE2 och *S. zooepidemicus* för ett protein kallat IdeZ2. Generna kodande för IdeE2 och IdeZ2 klonades och de rekombinanta formen av proteinerna uttrycktes i *E. coli*. Efter rening studerades den antikroppsklyvande förmågan m.h.a. en panel av renade antikroppar från olika djurslag inklusive människa (tabell 2). Resultaten visar att IdeE2 och IdeZ2 har en partiellt överlappande IgG endoproteasaktivitet jämfört med IdeE/IdeZ. En viktig skillnad är dock att IdeE2 och IdeZ2 effektivt klyver alla subklasser av IgG hos häst vilket skiljer dessa endoproteaser från IdeE och IdeZ.

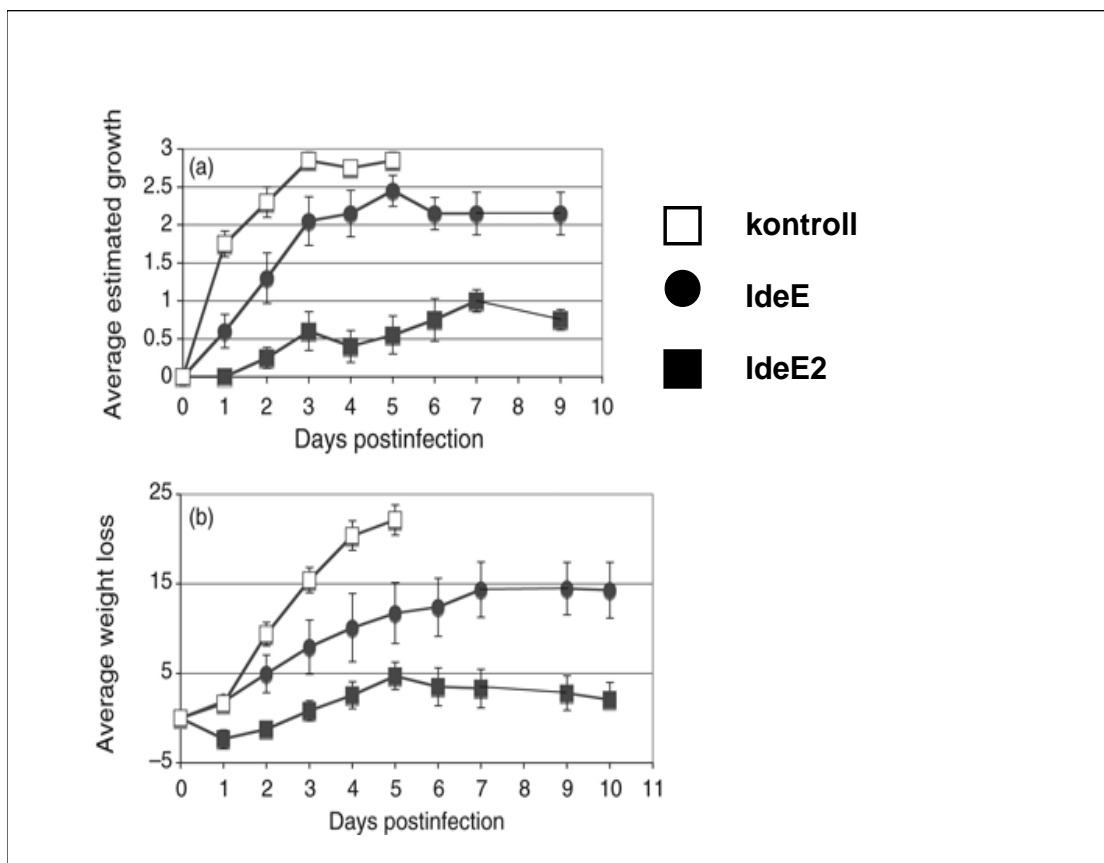
Table 2. Immunoglobulins from different species were incubated with recombinant IdeE, IdeZ, IdeE2 or IdeZ2 from Hulting et al 2009 (7)

	<i>IdeE</i>	<i>IdeZ</i>	<i>IdeE2</i>	<i>IdeZ2</i>
IgA mouse	–	–	–	–
IgM mouse	–	–	–	–
IgG mouse	+	+	–	–
IgA human	–	–	–	–
IgG human	+++	+++	++	+++
IgG horse	+	+	+++	+++
IgG rabbit	+++	+++	–	–
IgG cat	+++	+++	–	–
IgG bovine	++	++	–	+
IgG pig	+	+	+	–
IgG sheep	++	++	–	–
IgG goat	++	++	+	–
Horse serum 1 : 100	+	+	+++	+++

After incubation the samples were analysed using 8–25% SDS-PAGE. The proteolytic efficiency of each enzyme is summarized in the table as follows: –, no cleavage; +, weak cleavage; ++, medium cleavage or +++, strong cleavage.

Analyserar man aminosyrasekvenserna hos de IgG- klyvande proteinerna finner man att IdeE2 och IdeZ2 saknar det integrin-bindande motivet RGD vilket förekommer både hos IdeE och IdeZ. Detta betyder troligen att förutom att de har olika enzymatisk aktivitet att de också skiljer sig i andra biologiska funktioner såsom interaktioner med värdceller.

I samarbete med Prof. Jan-Ingmar Flocks forskargrupp vid Karolinska Institutet immuniserades möss med rekombinant IdeE och IdeE2 från *S. equi* för att studera om antikroppar mot proteinerna inducerar ett skydd vid senare experimentell infektion (challenge) med *S. equi*. Resultaten visade att immunisering av IdeE och IdeE2 inducerade ett skydd hos vaccinerade djur vid senare challenge (Fig.1).



Figur 1. Vaccination och challenge-försök i möss. Tre grupper av möss (10 i varje) vaccinerades intranasalt med rekombinant IdeE, IdeE2 eller enbart med adjuvant som kontroll. Efter vaccination infekterades mössen intranasalt med *S. equi* och analyserades dagligen för bakterietillväxt i nosen samt viktförändring. Den övre bilden visar bakterietillväxt i en semikvantitativ fyrstegsskala där 0 indikerar ingen tillväxt eller < 5 kolonier, 1 indikerar 5-100 kolonier, 2 indikerar >100 kolonier och 3 konfluent bakterieväxt på agarplattorna. Den nedre bilden visar den procentuella viktminskning efter challenge

Resultaten rörande IgG klyvande enzymerna IdeE2 och IdeZ2 har sammanfattats i en artikel med titeln "Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*" av Hulting *et al* 2009 vilken publicerats i FEMS Microbiol Lett. (7). Vad som också är mycket intressant och publicerats separat är att hästar som immuniserats med IdeE och IdeE2 bildar antikroppar som inhiberar enzymernas IgG-klyvande aktivitet (4).

Fibronektin och kollagen-bindande proteiner

En patogen bakteries förmåga att specifikt binda till komponenter hos värden är en viktig egenskap av betydelse i infektionsprocessen. Vi har tidigare rapporterat att *S. equi* och *S. zooepidemicus* har flera extracellulära proteiner vilka specifikt binder till olika proteiner i extracellulära matrix hos värden. Under projekttiden har dessa studier fortsatt där vi fokuserat våra studier till en grupp proteiner vilka specifikt binder fibronektin och/eller kollagen (Tabell 1). Studierna har innefattat att försöka kartlägga vilka delar av bakterieproteinerna som binder fibronektin resp. kollagen. Dessa studier fortgår, bl.a. använder vi biosensorteknologi för att studera interaktionen mellan de bakteriella proteinerna och värdcellsproteiner. Vidare avser vi att testa de fibronektin och kollagen-bindande proteinerna i den tidigare beskrivna kollagenkontraktionsmodellen som beskrivits i referenserna 16 och 17.

Vi har även fortsatt vårt samarbete med Prof. Rubins forskargrupp vid BMC, Uppsala universitet samt via Rubins kontakter samarbetat med Lunds universitet och Universitetet i Bergen vilket resulterat i en publicerad studie (17) rörande ett fibronektin och kollagen-bindande protein från *S. equi* kallat FNE (22). I cellförsök (kontraktionsmodellen) har vi visat att FNE genom sin bindning till både fibronektin och kollagen kan förstärka kollagenkontraktionen runt celler. I djurförsök har vi visat att proteinet FNE påverkar det "interstitial tissue pressure" (ITP) *in vivo* vilket kan ha betydelse vid ödembildning vilket i sin tur kan peka på en ny mekanism i infektionsprocessen (17). För att gå vidare i dessa studier har vi för avsikt att även studera *S. equi in vivo*. I samarbete med Ass. Prof. Andrew Wallers forskargrupp vid Animal Health Trust, Newmarket, UK, har en specifik deletionsmutant konstruerats som saknar genen kodande för FNE. Mutantens förmåga att påverka infektionsförloppet har undersökts i en infektionsmodell i vilken möss har infekterats subkutant. Preliminära data pekar på att det inte är någon signifikant skillnad mellan mutanten och kontrollstammen när man använder denna infektionsmodell. Är då FNE en betydelslös faktor i infektionsprocessen? Svaret är förmodligen nej. En tidigare studie visade att genen kodande för FNE förekom i alla undersökta kliniska isolat av *S. equi* (21). Dessutom kan man spekulera att någon av de andra fibronektin-kollagen-bindande proteinerna (Tabell 1) kan fungera som "back up" för förlusten av FNE. Vidare bör man även undersöka mutanten i andra infektionsmodeller.

I samarbete med Prof. Rubin har vi även fortsatt våra studier av det kollagen-bindande proteinet CNE från *S. equi* och dess interaktion med extracellulär matrix hos värden (28). Kollagenfibrer exponerar distinkta domäner vilka specifikt interagera med andra matrixproteiner och värdceller. Sammantaget visade försöken att CNE binder till nativa kollagenfibrer och att CNE specifikt inhiberar integrin $\alpha(V)\beta(3)$ beroende cellmedierad kollagenkontraktion, PDGF BB-inducerad och $\alpha(V)\beta(3)$ -medierad adhesion till celler och fibronektin-bindning till nativt kollagen. Vidare användes ett peptidbibliotek vilket täckte hela trippel helix- delen av kollagenproteinet för att identifiera det ställe till vilket CNE binder. Resultaten visade att CNE binder till två separata ställen där t.ex. det ena är känt för att binda kollagenaser, samt andra matrixproteiner såsom fibronektin. Sammantaget är resultaten rörande FNE och CNE mycket intressanta då de pekar på att *S. equi* kan uttrycka proteiner som specifikt skulle kunna påverka omkringliggande matrix i infekterad vävnad. Resultaten har publicerats i The Journal of Biological Chemistry författare van Wieringen 2010 (28).

Interaktionen mellan Mastceller och Streptococcus equi

En viktig del i världens immunologiska försvar mot bakterieinfektioner är aktiviteten hos världens Mastceller. Den molekylära bakomliggande mekanismen är endast delvis känd. I samarbete med Prof. Pejlers forskargrupp har vi studerat hur *S. equi* interagerar med Mastceller från möss. Resultaten från cellförsök där levande alternativt värmeinaktiverade *S. equi* celler samodlades visade bl. a. att levande bakteriecell i motsats till värmeinaktiverade celler inducerade frisättning av flera olika cytokiner och kemokiner hos Mastcellerna men låg frisättning av histamin. Resultaten visade också att frisättningen av cytokiner och kemokiner var starkt beroende på cell-cell kontakt mellan levande bakterier och Mastceller. Resultaten som bidragit till ett ökat kunnande om Mastcellernas roll vid en *S. equi* infektion har publicerats i *Infection and Immunity* 2010 Rönnerberg et al 2010 (23).

Tillämpad forskning

Ett av våra långsiktiga mål är att resultaten från vår grundläggande forskning, av de extracellulära proteinerna hos *S. equi*, ska kunna användas för att utveckla ett framtida vaccin mot främst kvarka men även mot infektioner orsakade av andra hästpatogena streptokocker såsom *S. zooepidemicus*. I anslagsmottagarens forskningsgrupp bedrivs sedan många år också ett tillämpat forskningsprojekt vars mål är att utveckla i första hand ett vaccin mot kvarka. Resultaten från denna del av forskningen är mycket lovande då det visar sig att vaccinering med ett subunit-vaccin bestående av en grupp rekombinanta *S. equi* proteiner ger ett mycket bra skydd hos hästar vid experimentella vaccination/challengeförsök. Dessa försök bedrivs som ett samarbete mellan Intervacc AB, SLU, Karolinska institutet och Animal Health Trust, Newmarket och resultaten har bl.a. redovisats i *PLoS Pathogen* Guss et al 2009 (4) samt vid nationella och internationella möten såsom serien "Getting to Grips with Strangles" vilka anordnas vartannat år.

Upplysningsvis har anslagsmottagaren medel för vaccinutvecklingen från företaget Intervacc AB (<http://intervacc.com/index.php?lang=sv>) vilket omfattar lön och drift för en senior forskare. Inga medel från Stiftelsen Hästforskning har stött denna tillämpade del av forskningen.

Publikationer relaterade till projektet

Refereegranskade internationella tidskrifter

Lidén, Å., van Wieringen, T., Lannergård, J., Kassner, A., Heinegård, D., Reed, R., K., **Guss, B.** and Rubin, K. (2008) A secreted collagen- and fibronectin-binding streptococcal protein modulates cell-mediated collagen gel contraction and interstitial fluid pressure *J. Biol. Chem.* 283:1234-1242.

Hulting, G., Flock, M., Frykberg, L., Lannergård, J., Flock, J.-I. and **Guss, B.** (2009) Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol Lett* 298:44-50.

Van Wiering, T., Kalamajski, S., Lidén, Å., Bihan, D., **Guss, B.**, Heinegård, D. Farndale, R.W. and Rubin, K. (2010) The streptococcal collagen-binding protein CNE specifically interferes with aVb3-mediated cellular interactions with triple-helical collagen, *J. Biol. Chem.* 285:35803-35813

Rönnerberg, E., **Guss, B.** and Pejler, G. (2010) Infection of mast cells with live streptococci causes a toll-like receptor 2-and cell-cell contact-dependent cytokine and chemokine response. *Infect Immun*, 78:854-864

Populärvetenskaplig artikel

Guss, B. (2008) Molekylärbiologi vapen mot kvarka. *Miljöforskning* 1: 21-22.
(Populärvetenskaplig artikel i FORMAS tidskrift)

Övrig resultatförmedling under projektiden

Under projektiden medverkade anslagsmottagaren som inbjuden föredragshållare vid två internationella workshops rörande kvarka kallade "Getting to grips with Strangles". Det första ägde rum i maj 2008 (Skottland) där titeln på föredraget var "Fibronectin-collagen binding proteins in virulence" och det andra ägde rum i maj 2010 (Stockholm) där titeln på föredraget var "IgG endopeptidases of *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*". Vid mötena deltog också forskarstuderande Greta Hulting samt forskaren Doc. Lars Frykberg från vår forskargrupp.

I samtliga ovan nämnda publikationer samt vid de internationella mötena "Getting to grips with Strangles" har anslagsmottagaren meddelat att Stiftelsen Hästforskning ekonomiskt stött forskningen.

Vidare har resultaten från forskningen presenterats för olika studentgrupper i olika kurser och andra sammanhang vid SLU. Resultaten från vaccinationsstudierna på häst (4) (Guss et al 2009 PLoS Pathog) har rönt stort intresse från olika håll såsom internationell och nationell press, radio och TV samt ett stort intresse från näringen.

Övrigt

Sammantaget har studierna varit mycket fruktsamma och lett till flera forskningssamarbeten både nationellt och internationellt (SLU, Uppsala univ., Lunds univ., Universitetet i Bergen, University of Cambridge samt Animal Health Trust).

Referenser

1. Flock, M., Jacobsson, K., Hirst, T., R., Franklin, A., **Guss, B.**, and Flock, J.-I. (2004) Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. *Infect Immun*. 72:3228-3236.
2. 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 strangles model in the mouse. *Vaccine* 24:4144-4155.
3. **Guss, B.**, Eliasson, M., Olsson, A., Uhlén, M., Frej, A.-K., Jörnvall, H., Flock, J.-I. and Lindberg, M. (1986) Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J*. 5: 1567-1575.
4. **Guss, B.**, Flock, M., Frykberg, L., Waller, A.S., Robinson, C., Smith, K.C. and Flock, J.-I. (2009) Getting to grips with strangles: an effective multi-component recombinant vaccine for the protection of horses from *Streptococcus equi* infection. *PLoS Pathog* Sep;5(9):e1000584.

5. Harrington, D.J., Sutcliffe, I.C. & Chanter, N. (2002) The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes Infect* 4, 501-10.
6. Holden MTG, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, et al. (2009) Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. *PLoS Pathog* 5(3): e1000346. doi:10.1371/journal.ppat.1000346
7. Hulting, G., Flock, M., Frykberg, L., Lannergård, J., Flock, J.-I. and **Guss, B.** (2009) Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol Lett* 298:44-50.
8. Jacobsson, K., Jonsson, H., Lindmark, H, **Guss, B.**, Lindberg, M. and Frykberg, L. (1997) Shotgun phage display mapping of two streptococcal cell-surface proteins. *Microbiol. Res.* 152:1-8.
9. Jonsson, H., Lindmark, H. and **Guss, B.** (1995) A protein G related cell surface protein in *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect Immun* 63: 2968-2975.
10. Karlström, Å. Jacobsson, K., Flock, M., Flock, J.-I. and **Guss, B.** (2004) Identification of a novel collagen-like protein, SclC in *Streptococcus equi* using signal phage display. *Vet. Microbiol* 104:179-188
11. Karlström, Å., Jacobsson, K. and **Guss, B.** (2006) SclC is a member of a novel family of collagen-like proteins in *Streptococcus equi* subspecies *equi* that are recognized by antibodies against SclC. *Vet. Microbiol.* 114:72-8.
12. 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.
13. Lannergård, J., Frykberg, L. and **Guss, B.** (2003) CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 222:69-74.
14. Lannergård, J. and **Guss, B.** (2006) IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp *equi*. *FEMS Microbiology Letters* 262:230-235.
15. 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)
16. 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.
17. Lidén, Å., van Wieringen, T., Lannergård, J., Kassner, A., Heinegård, D., Reed, R., K., **Guss, B.** and Rubin, K. (2008) A secreted collagen- and fibronectin-binding streptococcal protein modulates cell-mediated collagen gel contraction and interstitial fluid pressure. *J. Biol. Chem.* 283:1234-1242
18. Lidén, Å., van Wieringen, T., Lannergård, J., Karlström, Å., **Guss, B.** and Rubin, K. (2006) Effects of streptococcal extracellular matrix-binding proteins on α V β 3-directed collagen gel contraction (manuscript in Åsa Lidén doctoral thesis Uppsala University ISBN 91-554-6485-8.)
19. Lindmark, H. and **Guss, B.** (1999) SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. *Infect. Immun.* 67:2383-2388.
20. Lindmark, H. Jacobsson, K., Frykberg, L. and **Guss, B.** (1996) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*. *Infect. Immun.* 64: 3993-3999.
21. Lindmark, H., Jonsson, P., Olsson Engvall, E. and **Guss, B.** (1999) Pulsed-field gel electrophoresis and distribution of the genes *zag* and *fnz* in isolates of *Streptococcus equi*. *Res. Vet. Sci.* 66:93-99.
22. Lindmark, H., Nilsson, M. and **Guss, B.** (2001) Comparison of the fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* subspecies *equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus* reveals a major and conserved difference. *Infect. Immun.* 69: 3159-3163.
23. Rönnberg, E., Guss, B. and Pejler, G. (2010) Infection of mast cells with live streptococci causes a toll-like receptor 2- and cell-cell contact-dependent cytokine and chemokine response. *Infect Immun.* 78:854-864.

24. Sweeney, C.R., Timoney, J.F., Newton, J.R. & Hines, M.T. (2005) *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J Vet Intern Med* 19, 123-34.
25. Uhlén, M., **Guss, B.**, Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L. and Lindberg, M. (1984) Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A, a gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.* 259: 1695-1702.
26. Waller, A., Flock, M., Smith, K., Robinson, C., Mitchell, Z., Karlström, Å., Lannergård, J., Bergman, R., **Guss, B.** and Flock, J.-I. (2007) Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from *Streptococcus equi*. *Vaccine* 25: 3629-3635.
27. Waller, A.S. & Jolley, K.A. (2007) Getting a grip on strangles: Recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *Vet J* 173: 492-501.
28. Van Wiering, T., Kalamajski, S., Lidén, Å., Bihan, D., **Guss, B.**, Heinegård, D. Farndale, R.W. and Rubin, K. (2010) The streptococcal collagen-binding protein CNE specifically interferes with aVb3-mediated cellular interactions with triple-helical collagen, *J. Biol. Chem.* 285:35803-35813.