

CHROMBIO. 5016

Note**Isolierung eines Fibronektin-Rezeptors von *Streptococcus pyogenes* durch Affinitätschromatographie und anschliessender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

R. STING*, M. SCHMITT und H. BLOBEL

*Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus-Liebig-Universität,
6300 Giessen (B.R.D.)*

(Eingegangen am 28. July 1989; geänderte Fassung eingegangen am 5. September 1989)

Adhärenz von *Streptococcus pyogenes* an Epithelzellen der Mund- und Rachenschleimhaut hat zweifellos pathogene Bedeutung [1-3]. Das Glykoprotein Fibronektin, das auf der Oberfläche von Epithelzellen vorkommt, spielt bei der Adhärenz dieser Bakterien eine wichtige Rolle [4]. Durch Fibronektin-Bindungsstellen ist es Bakterien möglich, sich an Epithelzellen anzusiedeln und diese anschliessend zu durchdringen [2]. Mit Hilfe eines hochgereinigten Fibronektin-Rezeptors wird gezeigt, dass *S. pyogenes* Bindungsstellen für Fibronektin besitzt, die bei der Anheftung an Epithelzellen und somit im Infektionsgeschehen dieser Bakterien eine wichtige Rolle spielen.

EXPERIMENTELLES

Bakterieller Kulturüberstand

S. pyogenes A 45984 wurde in 5 l TSB (tryptic soy broth, Difco Labs., Detroit, MI, U.S.A.) für 22 h bei 37°C angezüchtet und anschliessend nach Abzentrifugieren der Bakterien (30 min, 13 000 g) sterilfiltriert (0,45 µm Porendurchmesser, Sartorius, Göttingen, B.R.D.). Eine Konzentrierung des zellfreien Kulturüberstandes auf ca. 250 ml erfolgte mit Hilfe eines Filtersystems (MillitanTM-Filtersystem, Millipore, Eschwege, B.R.D.).

Reinigung der Fibronektin-Rezeptoren

Fibronektin-Rezeptoren im Kulturüberstand wurden affinitätschromatographisch isoliert. Dazu koppelten wir 50 mg Fibronektin, das affinitätschromatographisch aus Blutplasma vom Menschen gereinigt wurde [5], an 10 g Bromcyan-aktivierte Sepharose (Sepharose Cl-4B, LKB, Uppsala, Schweden). Die Affinitätssäule wurde mit PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,5) equilibriert und nach Auftragen der Probe gespült. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 0,1 mol/l Glycin-HCl Puffer, pH 2,5. Die teilweise gereinigten Fibronektin-Rezeptoren wurden mit Polyethylenglycoll 35 000 (Merck, Darmstadt, B.R.D.) von 0,2 mg/ml auf 1 mg/ml konzentriert und 200 µg Protein auf eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Säule (TSK G3000SW, 600 mm×7,5 mm; LKB, Bromma, Schweden) oder "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC)-Säule (Superose™ 12 HR 10/30, 310 mm×13 mm; LKB) aufgetragen. Als Equilibrierpuffer dienten für die HPLC-Säule 0,1 mol/l Phosphatpuffer mit 0,1 mol/l NaCl and 0,02% Natriumazid, pH 7,3, und für die FPLC-Säule 0,05 mol/l Phosphatpuffer mit 0,05 mol/l NaCl and 0,02% Natriumazid, pH 7,3. Die Durchflussgeschwindigkeit für die HPLC-Säule betrug 0,5 ml/min, für die FPLC-Säule 0,3 ml/min. Fraktionen mit Fibronektin-Rezeptor-Aktivitäten (0,2 mg/ml) wurden mit Polyethylenglycoll 35 000 auf 0,7 mg/ml konzentriert und in der SDS (sodium dodecyl sulphate)-Polyacrylamidgel-elektrophorese [6], im "Western Blot" [7] und in der Autoradiographie [8] eingesetzt. Das SDS-Gel konnte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, B.R.D.) und mit Silber [9] gefärbt werden.

Bindungsversuche

Eine radioaktive Markierung des gereinigten Fibronektin-Rezeptors (100 µg) mit 100 µCi ¹²⁵I erfolgte unter Anwendung der Chloramin T Methode [10]. Für Bindungsversuche des ¹²⁵I-markierten Fibronektin-Rezeptors an Epithelzellen der Mundschleimhaut des Menschen wurden 40 000 Epithelzellen in 400 µl PBS suspendiert und mit 70 000 cpm 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bindungsversuche führten wir mit oder ohne Zusatz von Fibronektin (5–20 µg, Reinigung siehe oben), Antiserum gegen Fibronektin (5–20 µl; Dakopatts, Hamburg, B.R.D.), Fibrinogen (5–20 µg; Deutsche Kabivitrin, München, B.R.D.) oder Albumin (5–20 µg; Sigma, Deisenhofen, B.R.D.) durch. Fibrinogen wurde affinitätschromatographisch von Fibronektin gereinigt [5].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Mit Hilfe von Affinitätschromatographie (Fig. 1) an Fibronektin-Sepharose und anschließender Proteinreinigung mit HPLC (Fig. 2) oder FPLC (Fig. 3) konnte ein in den Kulturüberstand abgegebener Fibronektin-Rezeptor von *S. pyogenes* A 45984 in hochgereinigter Form gewonnen werden. Dieser gerei-

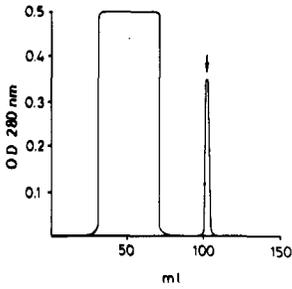


Fig. 1. Affinitätschromatographische Reinigung von Fibronectin-Rezeptoren von *Streptococcus pyogenes* A 45984 aus dem Kulturüberstand an Fibronectin-Sepharose. (↓) Eluierte Fraktionen mit Fibronectin-Rezeptor-Aktivität.

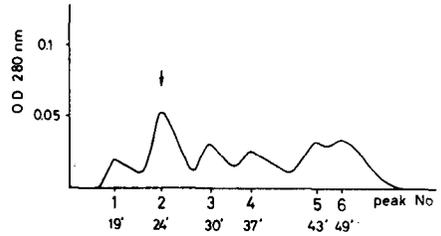


Fig. 2. Chromatographische Reinigung von Fibronectin-Rezeptoren mittels HPLC. Peak No. 2 (↓) des HPLC-Profiles enthält Proteine mit Fibronectin-Rezeptor-Aktivität.

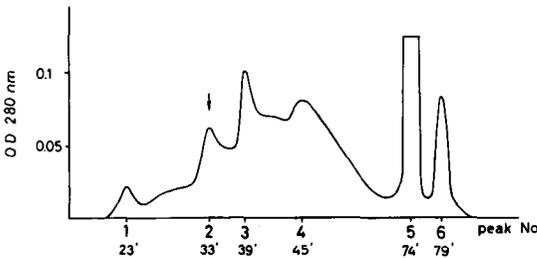


Fig. 3. Chromatographische Reinigung von Fibronectin-Rezeptoren mittels FPLC. Peak No. 2 (↓) des FPLC-Profiles enthält Proteine mit Fibronectin-Rezeptor-Aktivität.

nigte Fibronectin-Rezeptor zeigte sich in der SDS-Gelelektrophorese als ein einheitliches Protein mit einem Molekulargewicht von 120 000 D (Fig. 4). Sowohl im "Western Blot" als auch in der Autoradiographie zeigte der gereinigte Fibronectin-Rezeptor Bindungsaktivitäten. Chhatwall und Blobel [11] konnten zeigen, dass Fibronectin an Protease-empfindliche Rezeptoren der Streptokokken bindet. Simpson und Beachey [4] und Simpson et al. [12] beschrieben die Fibronectin-Bindungsstellen von *S. pyogenes* als einen Protein-Lipoteichonsäure-Komplex.

In vorliegenden Arbeit konnte ein Fibronectin-Rezeptor von *S. pyogenes* in hochgereinigter Form gewonnenen und in einem Pathogenitätsversuch eingesetzt werden. Der ^{125}I -markierte Fibronectin-Rezeptor band an Epithelzellen der Mundschleimhaut des Menschen. Diese Bindung konnte durch Zugabe von Fibronectin oder Antiserum gegen Fibronectin nicht aber durch Fibrinogen oder Albumin gehemmt werden (Fig. 5). Vergleichbare Ergebnisse findet man bei Simpson und Beachey [4] und bei Valentin-Weigand et al. [13], die die Adhärenz von Bakterien an Epithelzellen untersuchten. Darüber hinaus stell-

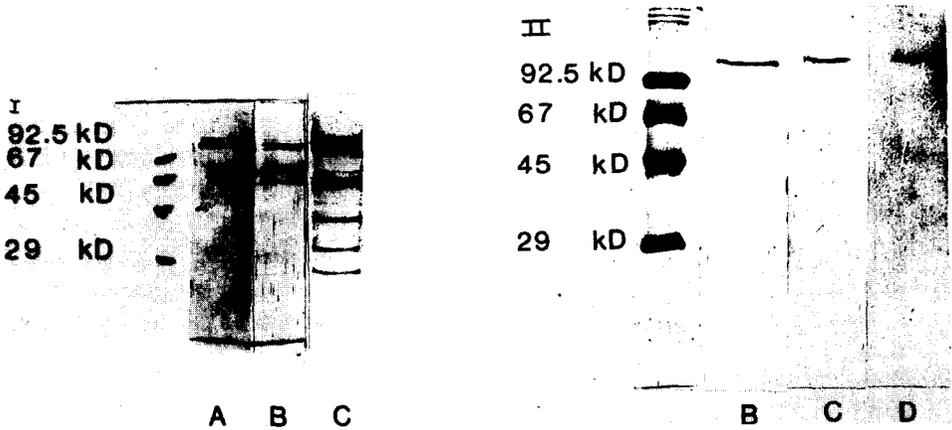


Fig. 4. Fibronektin-Rezeptoren von *Streptococcus pyogenes* A 45984. Isolierung nach Affinitätschromatographie (I) und weitere Reinigung durch HPLC bzw. FPLC (II). Mit Coomassie Brilliant Blue (A) und mit Silber (B) gefärbtes SDS-Gel, "Western Blot" (C) und Autoradiographie (D).

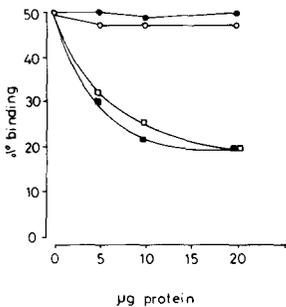


Fig. 5. Einfluss von Fibronektin (\square), Antiserum gegen Fibronektin (\blacksquare), Fibrinogen (\circ) oder Albumin (\bullet) auf die Bindung von ^{125}I -markierten Fibronektin-Rezeptor von *Streptococcus pyogenes* A 45984 an Epithelzellen der Mundschleimhaut des Menschen.

ten Johanson et al. [14] fest, dass ein proteolytischer Abbau von Fibronektin, das die Epithelzellen der oberen Atemwege bedeckt, eine Besiedlung mit Pseudomonasarten verringert. Bindungsstellen, die für die Anheftung von Bakterien an ihre Wirtszellen verantwortlich sind, könnten nach ihrer Reinigung zur Gewinnung von Impfstoffen Anwendung finden. Solche Impfstoffe aus Gonokokken-Fimbrien wurden bereits erfolgreich erprobt [15,16].

LITERATUR

- 1 E.H. Beachey, J. Infect. Dis., 143 (1981) 325-345.
- 2 R.J. Gibbons, in D. Schlesinger (Herausgeber), Microbiology, American Society of Microbiology, Washington, DC, 1977, pp. 395-406.

- 3 R.P. Gibbons und J. Van Houte, *Ann. Rev. Microbiol.*, 29 (1975) 19-44.
- 4 W.A. Simpson und E.H. Beachey, *Infect. Immunol.*, 1 (1983) 275-279.
- 5 S.J. Miekka, K.C. Ingham und D. Menacke, *Thromb. Res.*, 27 (1982) 1-14.
- 6 U.K. Laemmli, *Nature (London)*, 227 (1970) 680-685.
- 7 Ch. Lämmli, P. Schaufuss, Ch. Frede und H. Blobel, *Can. J. Microbiol.*, 34 (1988) 1-5.
- 8 Ch. Lämmli, Ch. Frede, K. Gürtürk, A. Hildebrand und H. Blobel, *J. Gen. Microbiol.*, 134 (1988) 2317-2323.
- 9 J. Heukeshoven und R. Dernick, *Electrophoresis*, 6 (1985) 103-112.
- 10 W.H. Hunter und F.C. Greenwood, *Nature (London)*, 194 (1962) 495-496.
- 11 G.S. Chhatwal und H. Blobel, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 10 (1987) 99-108.
- 12 W.A. Simpson, H.S. Courtney und I. Ofek, *Rev. Infect. Dis.*, 9 (1987) 351-359.
- 13 P. Valentin-Weigand, G.S. Chhatwal und H. Blobel, *Microbiol. Immunol.*, 31 (1987) 1017-1023.
- 14 W.G. Johanson, J.H. Higuchi, T.R. Chaudhuri und D.E. Woods, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 121 (1980) 55-63.
- 15 E. Tramont, J. Boslego, J. Sadoff, W. Zollinger, C. Brinton, J. Bryan und A. Labik, in J.P. Nelson und C. Grassis (Herausgeber), *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1980, pp. 1240-1242.
- 16 C. Brinton, A. Brown, K. Rogers, W. Guerina, S. Wood, J. Bryan, A. Labik, S. Polen und S. Lee, in J.P. Nelson und C. Grassis (Herausgeber), *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1980, pp. 1242-1245.