

## Caracterización de adhesinas fímbricas F17 de *Escherichia coli*. II. Propiedades estructurales\*

G. FURRAZOLA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1991

Aprobado en marzo de 1992

### RESUMEN

El tratamiento de fimbrias F17 de *E. coli* con metabisulfito de sodio, un reactivo que modifica residuos triptófano específicamente, hace desaparecer las propiedades hemaglutinantes de las mismas, sugiriendo que estos residuos desempeñan un papel importante en dicho fenómeno. A causa de que la subunidad estructural de estos apéndices no posee este aminoácido, estos resultados demuestran que las propiedades adhesivas de estas fimbrias residen en una subunidad menor, diferente de la subunidad estructural, siendo esta última conservada entre las distintas cepas.

Se reafirma la no existencia de fimbrias tipo 1 en estas cepas por observación al microscopio electrónico y *Western blotting* de las fimbrias purificadas.

### SUMMARY

Treatment of *E. coli* F17 fimbriae with sodium metabisulfite, a reagent that specifically modifies tryptophan residues, completely abolishes their haemagglutinating properties, suggesting its important role in this reaction. Since the major subunit of F17 fimbriae is devoid of tryptophan residues these results prove likewise that the adhesive

properties are localized in a minor subunit which is different from the major one; the last is conserved among the different strains.

The absence of type 1 fimbriae in these strains is confirmed by electron microscope observation and western blotting of purified fimbriae.

### INTRODUCCION

Es conocido que la adherencia de las bacterias a los receptores presentes en la superficie de las células eucarióticas ocurre por dos mecanismos posibles. En un caso, ejemplificado por las fimbrias K 88 de cepas de *E. coli* enteropatógenas, el dominio responsable de la unión al receptor es una parte integral de las subunidades estructurales repetitivas llamadas pilina (formadoras de los "pili"). En el otro caso, la adherencia es mediada por proteínas que están asociadas con las fimbrias, pero son distintas de las subunidades estructurales, o sea, la producción de la fimbria y las

---

\* Tesis presentada por el autor para el título de Master en Ciencias. Universidad Libre de Bruselas (*Interuniversity Postgraduate Programme of Tropical Molecular Biology*).

propiedades adhesivas de estas se hallan genéticamente separadas, por lo que se habla de subunidades estructurales mayores o monómeros y subunidades menores o proteínas adhesivas, las cuales son codificadas por genes diferentes (Mooi *et al.*, 1984; Hanson *et al.*, 1988; Krogfelt *et al.*, 1990). Los estudios genéticos recién realizados con las fimbrias F17 han demostrado que estas se incluyen dentro del segundo mecanismo, por lo que sus propiedades adhesivas no son atribuibles a la subunidad estructural sino a las subunidades menores o adhesinas presentes en la fimbria (Lintermans *et al.*, 1988; Lintermans *et al.*, 1991). Estos trabajos muestran que la subunidad estructural de estas fimbrias no contiene residuos triptófano, sin embargo, el gen que codifica para la adhesina, identificado por Lintermans *et al.* contiene 6 residuos triptófano. Es por esto que nos propusimos investigar la influencia que la modificación de estos residuos podría tener en la actividad aglutinante de la fimbria, conociendo que estos desempeñan un papel muy importante en la actividad aglutinante de este tipo de proteínas. Este trabajo se realiza como continuación del estudio previo realizado sobre las propiedades adhesivas y hemaglutinantes de estas adhesinas fimbrias, con el objetivo de lograr una caracterización más completa de las mismas.

## MATERIALES Y METODOS

### Modificación de residuos triptófano y estudios de protección

Las fimbrias purificadas fueron dializadas durante la noche a 4°C en solución tampón PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 g/L, KCL 0,2 g/L, NaCl 8 g/L y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,26 g/L) pH 7,2 y posteriormente fueron incubadas en las mismas condiciones con metabisulfito de sodio

20 mM. Después de dializar con PBS pH 7,2 se midió la actividad hemaglutinante de estas. Las fimbrias purificadas no tratadas fueron usadas como control.

Para estudiar el posible efecto protector de diferentes azúcares contra la modificación, las fimbrias fueron incubadas en 0,1 M de una solución de azúcar durante 30 minutos antes de la adición del metabisulfito de sodio (los azúcares utilizados aparecen en la tabla 1). Finalmente las muestras fueron dializadas extensivamente en PBS pH 7,2 y se midió su actividad hemaglutinante. Como controles fueron usadas fimbrias no modificadas así como fimbrias modificadas con metabisulfito de sodio. La inhibición de la actividad hemaglutinante por parte de estos azúcares sobre las fimbrias purificadas fue medida diluyendo serialmente a éstas en una solución 0,1 M del azúcar, incubando por 15 minutos y adicionando finalmente eritrocitos vacunos a 4°C preparados como se explica en el trabajo anterior.

## Microscopia electrónica

### Microscopia electrónica de barrido

Las perlas de Eupergit C-conjugadas con glicoproteínas usadas en los estudios de adhesión se fijaron durante 12 horas en solución tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 conteniendo 2,5% de glutaraldehído (v/v) y posteriormente en tetróxido de osmio al 1% durante toda la noche. Luego estas fueron lavadas extensivamente con agua destilada y deshidratadas con un gradiente de etanol y acetona. Las perlas fueron secadas en un secador de punto crítico usando  $\text{CO}_2$  líquido, cubiertas con oro y examinadas en un microscopio electrónico Phillips Modelo SEM 501.

### Tinción negativa

Las bacterias fueron teñidas (Todd *et al.*, 1984) y examinadas en un microscopio electrónico Phillips 201.

## Western blotting de fimbrias purificadas

Posterior a la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, las proteínas fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) en una celda Bio Rad Trans-Blot (Towbin *et al.*, 1979). La dilución del antisuero fue de 1/100 en PBS pH 7,2 conteniendo 0,03% de BSA (w/v). Para el revelado se usó una solución de conjugado Proteína A-peroxidasa (Amersham) y posteriormente con el reactivo revelador de color para peroxidasa (Biorad). El desarrollo del color fue detenido sumergiendo los filtros en agua destilada.

### Composición de aminoácidos

Un miligramo de proteína fue dividido en tres alícuotas e hidrolizado al vacío en una solución 5,7 N de ácido clorhídrico a 110°C durante 24, 48 y 72 horas. Se añadió una gota de una solución de fenol al 5% para proteger las tirosinas. La composición de aminoácidos fue determinada en un aparato Biotronik LC 5001. El triptófano fue determinado espectrofotométricamente (Beaven y Holliday, 1952).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Modificación de residuos triptófano

Se utilizó la cepa 32 KH85 ya que esta produce una evidente reacción de aglutinación de eritrocitos vacunos en placas de microtitulación a 4°C (agregados de gran tamaño). Después de incubar las fimbrias por cuatro horas con metabisulfito de sodio 20 mM se observó un marcado decrecimiento de la actividad hemaglutinante comparada con la actividad de la fimbria no modificada. Este reactivo modifica de forma específica los residuos triptófano, comprobándose que no reacciona con grupos sulfhidrilos. Cuando las fimbrias fueron incubadas toda la noche con el agente modificante a 4°C, la actividad hemaglutinante desapareció totalmente.

### Estudios de protección con azúcares

Después de comprobado el efecto modificador del metabisulfito de sodio, se estudió el efecto de diferentes azúcares sobre la hemaglutinación producida por estas fimbrias y su protección para prevenir la inactivación (tablas 1 y 2). Como se observa en la tabla 1, el mejor protector fue (NAG)<sub>2</sub>, mientras que el NAG y el (NAG)<sub>3</sub> fueron igualmente efectivos (25% de la

actividad inicial después de la modificación). Debemos destacar que la manosa tuvo igual efectividad que el NAG, aunque esta no bloquea la unión de la cepa 32 KH85 a las perlas de Eupergit-C-mucina. Es interesante notar que la mezcla de ambos azúcares proporcionó mejor protección (50%) que cada azúcar por separado. La ausencia de protección con glucosamina sugiere que el grupo N-acetil es esencial para la protección.

**Tabla 1**  
EFECTO DE DIFERENTES AZUCARES EN  
LA INACTIVACION DE FIMBRIAS F17  
POR METABISULFITO DE SODIO

Azúcar	Título de Hemaglutinación	
	1 hora	5 horas
Blanco	64	32
Blanco + Na-metab.	0	0
NAG	64	32
NAG + Na-metab.	16	8
(NAG) <sub>2</sub>	64	32
(NAG) <sub>2</sub> + Na-metab.	64	32
(NAG) <sub>3</sub>	64	64
(NAG) <sub>3</sub> + Na-metab.	16	4
Manosa	64	32
Manosa + Na-metab.	16	4
MMP	64	32
MMP + Na-metab.	0	0
Maltosa	64	32
Maltosa + Na-metab.	8	2
Manan	64	64
Manan + Na-metab.	0	0
Manosa + NAG	64	64
Manosa + NAG + Na-metab.	32	16
Glucosa	64	32
Glucosa + Na-metab.	16	4
MGP	64	32
MGP + Na-metab.	0	0
Glucosamina	64	32
Glucosamina + Na-metab.	0	0
Galactosa	64	32
Galactosa + Na-metab.	0	0
Fructosa	64	64
Fructosa + Na-metab.	8	0

**Tabla 2**  
**EFFECTO DE DIFERENTES AZUCARES**  
**SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE**  
**DE FIMBRIAS F17 (CEPA 32 KH85)\***

Azúcar	Título de hemaglutinación
Control	64
(NAG)	0
(NAG) <sub>2</sub>	0
(NAG) <sub>3</sub>	0
Glucosamina	4
Manosa	16
MGP	64
MMP	64
Fructosa	64
Glucosa	64
Maltosa	64
Manan	64
Galactosa	64

\* NAG: N-acetil-D-glucosamina;  
 (NAG)<sub>2</sub>: N,N'-diacetilquitobiosa;  
 (NAG)<sub>3</sub>: N,N',N"-triacetilquitotriosa;  
 MEP: Metil-D-glucopiranosido;  
 MMP: Metil-D-manopiranosido.

Después de diluir las fimbrias en los diferentes azúcares, se observó que NAG, (NAG)<sub>2</sub> y (NAG)<sub>3</sub> bloquearon completamente la hemaglutinación de eritrocitos vacunos. Además de estos azúcares, solo glucosamina y manosa bloquearon en cierto grado la reacción, pero este efecto solo se apreció después de incubación toda la noche a 4°C (tabla 2). La importancia de los residuos triptófano para la actividad de algunas lectinas de plantas ha sido evidenciado en otros estudios realizados usando modificación química de este aminoácido.

En un estudio sobre el efecto de la modificación de estos residuos en la lectina básica de una especie de frijol (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) usando N-bromosuccinimida y 2-hidroxi-5-nitrobenzyl bromuro, se observó que estos compuestos, que producen oxidación de los residuos triptófano, causaban pérdida de la actividad hemaglutinante de esta proteína. La inactivación con N-bromosuccinimida se evitó con D-galactosa, el azúcar específico reconocido por esta lectina, concluyéndose que la pérdida de la actividad se debió al daño provocado al residuo triptófano presente en el sitio de unión al azúcar (Higuchi *et al.*, 1985).

Para la lectina de *Abrus precatorius* específica para galactosa, se demostró que la modificación de residuos triptófano con el mismo reactivo usado por Higuchi, resultó en una inactivación completa de la misma, demostrando que estos residuos son esenciales para la unión al azúcar. Se observó protección parcial en presencia de concentraciones saturantes de lactosa (0,15 M) (Patanjali, 1984).

Similarmente, la modificación de residuos triptófanos produjeron una disminución en la actividad aglutinante en lectinas de embriones de trigo y chícharo (Bures *et al.*, 1972; Cermakova *et al.*, 1976).

La modificación de residuos triptófanos con el metabisulfito de sodio provocó la desaparición de la actividad enzimática en algunas enzimas tales como fumarasa y lisozima, así como la pérdida de la actividad aglutinante de algunas lectinas (Van Driessche, 1986).

En nuestro caso, la modificación de estos residuos con la consiguiente pérdida de la actividad hemaglutinante de las fimbrias F17 purificadas corrobora los resultados obtenidos hasta el momento acerca de la

existencia de una adhesina que difiere de la subunidad estructural. Esta inactivación evidencia que la molécula de adhesina difiere de esta subunidad estructural y que los residuos triptófanos están implicados directamente en la unión a carbohidratos o en la organización estructural del sitio de unión.

### Microscopia electrónica

Las fimbrias F17 pueden ser observadas al microscopio electrónico como apéndices largos y flexibles que sobresalen de la superficie bacteriana. Basándonos en su morfología, estos pueden ser fácilmente diferenciados de las fimbrias tipo 1 que son más gruesas y rígidas. Después de una observación detallada de todas las cepas de *E. coli* productoras de fimbrias F17 se puede concluir que éstas no presentan fimbrias tipo 1 en su superficie (Figs. 1 y 2).

### Western blotting

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo subunidades fímbricas F17 y tipo 1 transferidas después de electroforesis, fueron tratadas con antisuero F17.

Como se observa en la figura 3, los anticuerpos reconocen la subunidad estructural de las cepas F17, pero no la del tipo 1. Cuando los geles fueron sobrecargados de proteínas, se observan bandas de alto peso molecular en las tres fimbrias F17. Estas probablemente representen subunidades fímbricas F17 asociadas o no completamente dissociadas. En algunos casos se ha demostrado la presencia de anticuerpos que reconocen estructuras cuaternarias de la fimbria y otros que reaccionan con determinantes antigénicos accesibles sólo cuando las subunidades fímbricas han sido dissociadas (Abraham *et al.*, 1983; Karch *et al.*, 1985).

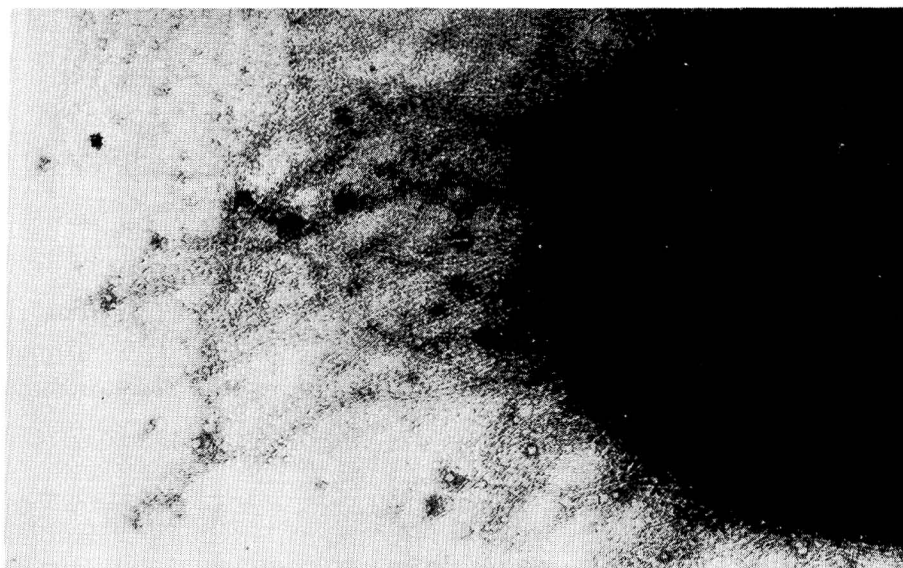


FIG. 1. Microfotografía electrónica de *E. coli* (Cepa Att 25 233S85) portando fimbrias F17 en su superficie (129 000 x).

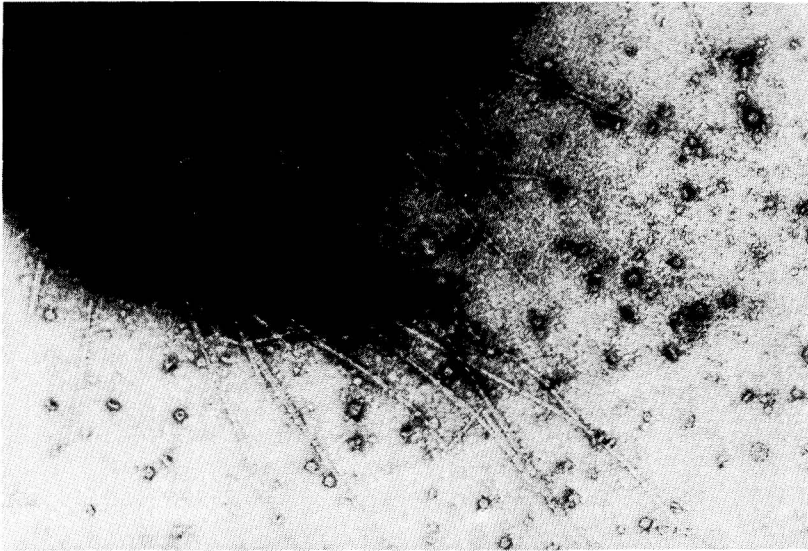


FIG. 2. Microfotografía electrónica de *E. coli* (Cepa K 514) portando fimbrias tipo 1 en su superficie (91 700 x).

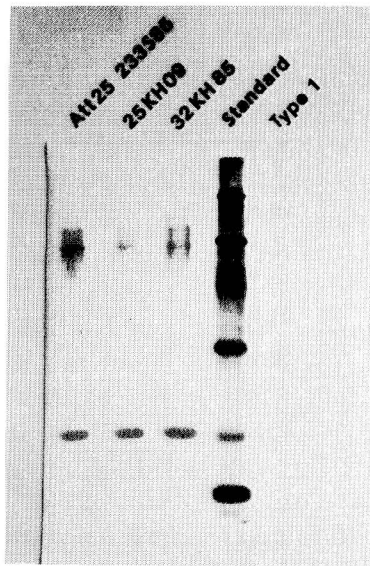


FIG. 3. *Western blotting* de fimbrias F17 y tipo 1 purificadas usando antisuero F17.

### Composición de aminoácidos

Como se observa en la tabla 3, la composición aminoacídica de las tres fimbrias F17 de cepas diferentes es

prácticamente idéntica y se corresponde con los datos obtenidos previamente a partir de la secuencia del gen estructural de la fimbria F17 (Lintermans *et al.*, 1988).

**Tabla 3**  
**COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE FIMBRIAS F17 DE DIFERENTES CEPAS Y FIMBRIA TIPO 1**

Residuo	Secuencia obtenida del gen	Att 25	25 KH09	32 KH85	Tipo 1
Asp(Asn)	23	26	26	27	19
Thre	23	23	23	23	19
Ser	15	15	15	15	9
Glu(Gln)	13	13	13	14	14
Pro	4	4	4	4	2
Gly	13	14	14	15	17
Ala	25	24	24	24	31
Cys	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Val	17	19	20	20	15
Met	1	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Ileu	9	7	7	7	4
Leu	14	12	12	12	10
Tyr	8	8	8	8	2
Phe	8	4	4	4	7
His	4	Trazas	Trazas	Trazas	2
Lys	0	8	8	8	4
Arg	8	1	1	1	3
Tryp	0	0	0	0	0

Como ha quedado evidenciado, la subunidad mayor estructural es conservada entre distintas cepas y las subunidades menores o adhesivas son heterogéneas en cuanto a sus sitios de unión a carbohidratos; esto explicaría las diferencias mostradas en la unión a estos. La ausencia de otras estructuras presentes en la superficie de estas bacterias (p. ej. flagelos), así como la buena accesibilidad de las glicoproteínas covalentemente acopladas a las perlas, excluye posibles interferencias en la interacción de las adhesinas con sus receptores, dos factores que podrían influir en las diferencias en las propiedades adhesivas (Ofek *et al.*, 1982).

La observación de que el mejor protector contra la modificación de los residuos triptófano producida por el metabisulfito de sodio en la cepa 32 KH85 es el (NAG)<sub>2</sub>, sugiere que también el sitio de unión de esta adhesina fímbrica podría estar

compuesto por dos subsitios o ser un sitio "extendido", como en el caso de las otras cepas. Esta idea también se apoya en el hecho de que la manosa, que no inhibe la unión a las perlas recubiertas con las glicoproteínas, también protege en cierta medida contra la inactivación y además la hemaglutinación en microplacas puede también ser inhibida parcialmente con manosa. El subsitio de unión a manosa podría no estar involucrado en la unión a la glicoproteína mucina, pero sí en la unión a los receptores de eritrocitos.

La microscopía electrónica y los resultados del *Western blotting* de estas proteínas reafirman los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo (*Parte I: Propiedades adhesivas y hemaglutinantes*) con relación a la ausencia de fimbrias tipo 1 en las cepas de *E. coli* portando fimbrias F17 y, por tanto, la atribución de las propiedades observadas a éstas últimas.

**REFERENCIAS**

- ABRAHAM, S.N.; D.L. HASTY; W.A. SIMPSON y E.H. BEACHEY (1983). Antiadhesive properties of a quaternary structure-specific hybridoma antibody against type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* **158**: 1114-1128.
- BEAVEN, G.H. y E.R. HOLLIDAY (1952). Ultraviolet absorption spectra of proteins and aminoacids. *Adv. Prot. Chem.* **7**: 325-345.
- BURES, L.; G. ENTLICHER y J. KOCOUREK (1972). Studies on phytohemagglutinins XI. Importance of tryptophan residues for the activity of pea phytohemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **285**: 235-242.
- CERMAKOVA, M.; G. ENTLICHER y J. KOCOUREK (1976). Studies on phytohemagglutinins XXVII. A study of the pea lectin binding site. *Biochim. Biophys. Acta* **420**: 236-245.
- HANSON, M.S.; J. HEMPEL y C.C. BRINTON, Jr. (1988). Purification of the *Escherichia coli* type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. *J. Bacteriol.* **170**: 3350-3358.
- HIGUCHI, M.; K. INOUE y K. IWAI (1985). A tryptophan residue is essential to the sugar binding site of winged bean basic lectin. *Biochim. Biophys. Acta* **829**: 51-57.
- KARCH, H.; H. LEYING; P. GORONCY-BERMES; H.P. KROLL y W. OPFERKUCH (1985). Three-dimensional structure of fimbriae determines specificity of immune response. *Infect. Immun.* **50**: 517-522.
- KROGFELT, K.A.; H. BERGMANS y P. KLEMM (1990). Direct evidence that the Fim H protein is the manose-specific adhesin of *E. coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* **58**: 1995-1998.
- LINTERMANS, P.F.; P. POHL; F. DEBOEK; A. BERTELS; C. SCHLICKER; J. VANDEKERCKHOVE; J. VAN DAMME; M. VAN MONTAGU y H. DE GREVE (1988). Isolation and nucleotide sequence of the F17 A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **56**: 1475-1484.
- LINTERMANS, P.F.; A. BERTELS; C. SCHLICKER; F. DEBOECK; G. CHARLIER; P. POHL; M. NORNGREN; S. NORMARK; M. VAN MONTAGU y H. DE GREVE (1991). Identification, characterization and nucleotide sequence of the F-17 G gene, which determines receptor binding of *Escherichia coli* F17 fimbriae. *J. Bacteriol.* **173**: 3366-3373.
- MOOI, F.R.; M. VAN BUUREN; G. KOOPMAN; B. ROOSENDAL y F.K. DE GRAAF (1984). K88ab gene of *Escherichia coli* encodes a fimbriae like protein distinct from the K88ab fimbrial adhesin. *J. Bacteriol.* **159**: 482-487.
- OFEK, I.; J. GOLDBAR; Y. ESHDAT y N. SHARON (1982). The importance of manose specific adhesins (lectins) in the infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **33**: 61-67.
- PATANJALI, S.R.; M.J. SWAMY; V. ANANTHARAN; M.I. KHAN y A. SUROLIA (1984). Chemical modification studies on Abrus agglutinin. Involvement of tryptophan residues in sugar binding. *Biochem. J.* **217**: 773-781.
- TODD, W.J.; J.P. WRAY y P.J. HITCHCOCK (1984). Arrangement of pili in colonies of *Neisseria gonorrhoea*. *J. Bacteriol.* **159**: 312-320.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN y J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4352.
- VAN DRIESSCHE, E.; S. BEECKMANS; S. DEJAEGERE y L. KANAREK (1986). "Thiourea: The antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues". In: *Zuivering, Karakterisatie en Fysiologische Functie van Leguminosae en Solanaceae lectinen*. Doctoral Thesis: E. Van Driessche, pp. 221-266.