



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DA HEMAGLUTININA TEMPERATURA
SENSÍVEL DE *Escherichia coli***

Londrina
2006

RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DA HEMAGLUTININA TEMPERATURA
SENSÍVEL DE *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Jabur
Gaziri

Londrina
2006

RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DA HEMAGLUTININA TEMPERATURA
SENSÍVEL DE *Escherichia coli***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson José Venancio

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Profa. Dra. Ionice Felipe

Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto

Prof. Dr. Luis Carlos Jabur Gaziri

Londrina, 20 de fevereiro de 2006

DEDICATÓRIA:

Às minhas filhas, Giovanna e Giuliana, que são a razão de tudo o que faço.

Ao meu marido, Claudio, pelo grande apoio, companheirismo, paciência e dedicação constante à nossa família.

Aos meus pais, Macoto e Litsuko, que, com exemplos de vida, me ensinaram a força da perseverança, da fé e do amor.

Aos meus irmãos, Guilherme e Thomaz, pelo incentivo e companheirismo, apesar da distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Jabur Gaziri, pela orientação e dedicação.

À Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto, pela confiança depositada em mim e pela acolhida em seu laboratório com dedicação, estímulo e oportunas sugestões; e por ser exemplo fiel de pesquisadora. Minha sincera amizade e admiração.

À Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis, pelas valiosas sugestões e constante apoio e amizade.

À Profa. Dra. Ionice Felipe, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por aceitar de maneira desprendida participar da banca desta tese.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio, pelos conselhos e ensinamentos no decorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela amizade e apoio constantes.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Prof. Dr. Carlos M. Nozawa, Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, Profa. Dra. Jacinta S. Pelayo, Profa. Dra. Márcia C. Furlaneto, Prof. Dr. Marco A. Nogueira, Profa. Dra. Regina L. dos Santos, Profa. Dra. Rosa Elisa C. Linhares e Profa. Dra. Sueli F. Y. Ogatta, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos eternos professores, Dra. Shiduca Itow Jankevicius e Dr. José Vitor Jankevicius, pelos ensinamentos e por terem sido exemplos de dedicação na vida profissional.

Ao Prof. Dr. Ivens G. Guimarães e sua equipe, pelo auxílio técnico, ensinamentos e sugestões.

À funcionária Jussevânia S. Rubbo de Sá pelo competente apoio técnico, incentivo e sincera amizade.

À secretária da Microbiologia, Nalva, pela eficiência e prontidão no auxílio e amizade constante.

Aos demais funcionários do Departamento de Microbiologia e do Departamento de Ciências Patológicas pelo apoio e amizade.

Ao funcionário Pedro S. R. Dionizio Filho, pelo auxílio prestado e valiosas sugestões.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação: Viviane, Claudia, Márcia, Lauretti, Audrey, Fabiana, Ivete, Berenice, Wagner, Fabrício, pelos anos de convívio e amizade.

Aos amigos vizinhos de Laboratório, Érica e Sasaki, pela amizade e colaborações nos experimentos.

Às amigas do Laboratório NIP 3, as mestrandas Dóris, Kátia, Michelle, Paula; as estagiárias Francielle, Geizecler, Marisa, Natália e veterinária Juliana, pelas colaborações nos experimentos, e muito mais pelo carinho e amizade sincera, fortalecidas durante estes anos de convívio.

À amiga Flora, pela sua amizade fraterna, por me ajudar nos momentos difíceis e me incentivar na caminhada. Sem você, tudo seria muito mais difícil, obrigada amiga.

Aos amigos Benito e Kely Cristina pela compreensão, companheirismo e amizade.

Ao Sr. Motomu Okino e Júlia Okino, pelo apoio, amizade e valiosa cooperação.

À Alessandra M. Okino, Arnaldo A. Okino e Áurea K. Okino, pela amizade e incentivo constantes.

À Tereza Braz Teixeira e sua família, à quem confiei o cuidado de minhas filhas, durante minha ausência, e sei que o fez com tanta ou mais dedicação que eu. Obrigada.

Finalmente, um agradecimento muito especial àqueles que mais contribuíram para a execução deste trabalho: meus pais Macoto e Litsuko, meu marido Claudio e minhas filhas Giovanna e Giuliana.

Não só foram capazes de respeitar a minha vontade como aceitaram meu afastamento de casa, e viveram de tal modo a não permitir que minha ausência atrapalhasse o equilíbrio de nossas vidas.

RESUMO

Escherichia coli é um agente importante de infecções extraintestinais em humanos e em animais. Em aves, é responsável por grandes perdas econômicas, sendo conhecida como *E. coli* patogênica para aves (APEC), e causa a colibacilose, a qual inicia como infecção do trato respiratório e evolui para aerosaculite, pericardite, perihepatite e septicemia. Vários genes de virulência estão envolvidos, sendo *tsh* um deles. O gene *tsh* codifica a proteína autotransportada hemaglutinina temperatura sensível (Tsh), que tem atividade hemaglutinante e proteolítica. Tsh é sintetizada como uma proteína precursora de 140 kDa, que é clivada, em um domínio passageiro de 106 kDa (Tsh_s) e um beta-domínio de 33 kDa (Tsh_β). Em nosso trabalho observamos que a presença destas proteínas é dependente da temperatura e do meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano. Observamos ainda que, tanto a Tsh recombinante (140 kDa) quanto o sedimento da amostra selvagem APEC 13, que contém Tsh_β (33 kDa), aglutinaram eritrócitos de galinha. Tanto a Tsh recombinante (140kDa) quanto o sobrenadante da APEC 13, que contém Tsh_s (106 kDa), causam proteólise da mucina. O anti-Tsh do soro de galinha inibiu a hemaglutinação da APEC 13 e da recombinante *E. coli* BL21/pET101-*tsh*, e inibiu também a atividade mucinolítica da proteína Tsh. A comprovação da atividade mucinolítica da proteína Tsh, foi possível através de SDS-PAGE em géis copolimerizados com mucinas de diferentes origens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	22
3 CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	34
ANEXO 1 ARTIGO 1: EXPRESSION, HEMAGGLUTINATING AND MUCINOLYTIC ACTIVITIES OF THE TSH PROTEIN FROM AN AVIAN PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> (APEC) STRAIN	35
ANEXO 2 ARTIGO 2: DETECTION OF TSH PROTEIN MUCINOLYTIC ACTIVITY BY SDS PAGE	45

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli, é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, componente da microbiota normal de humanos e animais; e agente de infecções intestinais e extraintestinais em diferentes hospedeiros. As amostras patogênicas de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) constituem grave problema para a saúde humana, uma vez que podem estar envolvidas em infecções do trato urinário, meningites em recém-natos e septicemias. ExPEC também afeta o setor de agronegócios, levando a perdas econômicas significantes na criação de animais, especialmente na indústria avícola (Mokady et al., 2005), onde é conhecida como *E. coli* patogênica para aves (APEC).

Uma correlação entre APEC e ExPEC humana, principalmente *E. coli* patogênica urinária (UPEC), tem sido extensivamente pesquisada. Estas amostras de *E. coli* apresentam similaridades nos sorogrupos, nos grupos filogenéticos e nos genes de virulência (Rodriguez-Siek et al., 2005b). Isso se deve, provavelmente, aos desafios semelhantes enfrentados quando estabelecem uma infecção extraintestinal. Ainda não foi comprovado que APEC serviria como fonte de ExPEC ou como reservatório de genes de virulência para ExPEC, porém deve ser considerado que APEC geralmente apresenta vários genes de virulência, insinuando alto grau de risco zoonótico (Mokady et al., 2005; Rodriguez-Siek et al., 2005b). Para a comprovação do risco zoonótico, ou mesmo para melhor compreensão de ExPEC, é necessário maior esclarecimento a respeito do papel dos fatores de virulência envolvidos no desenvolvimento de infecções por APEC.

Nas aves, *Escherichia coli* está presente como microbiota normal no trato gastrointestinal, na proporção de $10^4 - 10^7$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de fezes. Essa bactéria também coloniza o trato respiratório superior (faringe e traquéia), podendo ser isolada da pele e das penas, dependendo do nível de contaminação do ambiente. No entanto, a presença de inúmeros fatores de virulência envolvidos confere à APEC, capacidade de causar infecções extraintestinais (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Infecções extraintestinais por APEC resultam em várias doenças, sendo colibacilose a mais conhecida. Inicia-se com infecção do trato respiratório, referido como aerosaculite, e se não tratada, pode evoluir para bacteremia, infecção

generalizada e morte. Esta síndrome acomete principalmente aves de 4 a 9 semanas, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em frangos e perus (Gross, 1994). O trato respiratório é o principal alvo de APEC, onde geralmente atua como agente secundário após infecção inicial por vírus de Newcastle (NDV), vírus da bronquite infecciosa (IBV) ou *Mycoplasma gallisepticum* (Nakamura et al., 1992; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). A susceptibilidade das aves à infecção por APEC é aumentada pela deciliação das células epiteliais do trato respiratório superior seguida pela exposição à amônia e poeira (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Acredita-se que esta infecção inicia-se após inalação de partículas de pó contaminadas com fezes (Gross, 1994).

O trato respiratório das aves é extremamente vulnerável à colonização e invasão bacteriana, pois os sacos aéreos não possuem mecanismos de defesa celular residentes, sendo os mecanismos de defesa do trato respiratório ineficientes (Pourbakhsh et al., 1997a; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Após colonização e invasão do trato respiratório, as cepas de APEC podem atingir a corrente sanguínea evoluindo para septicemias, pericardites ou perihepatites, pois a região capilar pulmonar, assim como os sacos aéreos atuam como importantes portas de entrada de APEC para a corrente sanguínea (Pourbakhsh et al., 1997a; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Pourbakhsh et al. (1997b), examinando a dinâmica da infecção em frangos após a inoculação nos sacos aéreos de amostras de *E. coli* de alta virulência e de baixa virulência, observaram que após 6h da inoculação, somente as amostras de alta virulência eram encontradas no sangue, associadas a macrófagos nos sacos aéreos e pulmões dos frangos inoculados. Este fato sugere que a resistência à fagocitose é um importante fator de virulência que favorece o desenvolvimento da colisepticemia aviária (Pourbakhsh et al., 1997b; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Células fagocíticas tais como heterófilos e macrófagos funcionam como defesa primária contra os microrganismos invasores. Porém amostras capsuladas (K1), ou pertencentes ao sorogrupo O78, ou possuidoras da fimbria P impedem a associação inicial com fagócitos e apresentam mecanismos protetores contra os efeitos bactericidas destes após a ocorrência da associação (Mellata et al., 2003a). Outro mecanismo de resistência à fagocitose, já descrito em amostras APEC, é o processo de apoptose (Rodrigues et al., 1999), onde amostras de APEC são capazes de induzir apoptose ou morte celular programada, em macrófagos

quando fagocitadas. Este processo, também descrito em outros patógenos como *Shigella flexneri*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella sp*, *Leptospira sp*, *Mycobacterium tuberculosis*, pode ser importante fator de virulência, através do qual a APEC escapa da defesa primária do sistema imune, visto que a morte celular e a subsequente resposta inflamatória rompem as junções celulares e favorecem a translocação bacteriana através das barreiras epiteliais (Finlay & Cossart, 1997).

A habilidade da bactéria em persistir em fluidos corpóreos (fluido pericárdico e sangue) e órgãos internos como pulmão, fígado, baço e sacos aéreos, está correlacionada à resistência à atividade lítica do soro, uma vez que as bactérias sensíveis ao soro são incapazes de colonizar órgãos internos. Mellata et al. (2003b), pesquisando cepas mutantes, demonstraram que lipopolissacarídeo O78 e cápsula K1 estão envolvidos no processo patogênico e que a resistência sérica é um dos mecanismos usados para alcançar os órgãos internos das aves testadas.

Outros fatores de virulência que tem sido relacionados à resistência sérica são antígeno capsular K5, e proteínas de membrana externa TraT, OmpA e Iss (Pfaff-McDonough et al., 2000).

Além de resistir às defesas imunológicas, APEC precisa ser capaz de se multiplicar em líquidos fisiológicos do hospedeiro, os quais se caracterizam pela baixa concentração de íons ferro, uma vez que estes estão complexados a proteínas, como hemoglobina, transferrina e ovotransferrina. O ferro é essencial para toda célula viva e *E. coli* utiliza o ferro para o transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos. Assim sendo, amostras ExPEC, inclusive APEC e UPEC, possuem sistemas de captação de ferro adicionais. Estes sistemas podem ser mediados por sideróforos aerobactina, enterobactina ou outros, sendo aerobactina o mais frequente (La Ragione & Woodward, 2002; Mokady et al., 2005).

Aerobactina se caracteriza por ser um composto formado a partir de duas moléculas de lisina e uma de citrato, que compete pelo ferro ligado às proteínas do hospedeiro. Aerobactina férrica liga-se a um receptor presente na membrana externa da bactéria, de 74kDa, induzido pelo estresse de ferro e codificado pelo gene *iutA*. O gene *iuc* codifica a enzima responsável pela síntese da aerobactina. Estes genes estão localizados no plasmídeo ColV ou em cromossomos. O sistema aerobactina tem sido detectado em 73-98% das APEC (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Rodriguez-Siek et al., 2005a).

O passo fundamental para o desenvolvimento da colisepticemia aviária é a colonização bacteriana do trato respiratório, a qual está associada a adesinas fimbriais e afimbriais (Dho & Lafont, 1982; Maurer et al., 1998). As propriedades de aderência de *E. coli* foram primeiramente reconhecidas através da técnica de aglutinação de eritrócitos na presença de cepas bacterianas. Estas observações foram posteriormente confirmadas e correlacionadas com a presença de fímbrias, através do uso de microscopia eletrônica (Parry & Rooke, 1985). Portanto, a atividade hemaglutinante tem sido um dos critérios de classificação das fímbrias, permitindo classificá-las em três categorias: fímbrias manose-sensível (tipo 1), que reconhecem resíduos D-manose em eritrócitos de cobaio e cuja hemaglutinação é inibida na presença da D-manose; fímbrias manose-resistentes que se caracterizam por reconhecerem resíduos diferentes da D-manose, sem que a hemaglutinação seja inibida em presença da mesma; e fímbrias não hemaglutinantes (Morris, 1983; Babai et al., 2000).

As mais extensivamente estudadas são fímbria tipo 1 e fímbria P. Fímbria tipo 1 é expressa por *E. coli* no trato respiratório, pulmões e sacos aéreos das aves infectadas, indicando um possível papel durante o estágio inicial da doença (Dozois et al., 1995). Já a fímbria P parece atuar num estágio posterior desta infecção (Pourbakhsh et al., 1997c).

Vidotto et al. (1997), observando a aderência manose-sensível de amostras APEC, na região de muco do epitélio traqueal de pintos, também sugeriram que a fímbria tipo 1 é uma ferramenta importante na fixação da bactéria ao epitélio traqueal das aves na fase inicial do processo de colonização.

Fímbria tipo 1 (F 1) apresenta-se como estrutura filamentosa de 7nm de diâmetro e 0,5 a 2 μ m de comprimento, composta de unidade polipeptídica repetida de 17kDa (Duguid & Old, 1980; Clegg & Gerlach, 1987), e consiste em uma proteína maior (FimA), associada à subunidades menores FimF, FimG e a adesina FimH. Estas são codificadas pelo grupo de genes cromossômicos fim, e compreendem nove genes, sete dos quais estão presentes em um único operon (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Está freqüentemente presente em amostras patogênicas, sendo porém, também encontrada em amostras comensais. McPeake et al. (2005) encontraram o gene fimH da fímbria tipo 1 em 96,5% dos isolados de colibacilose e em 92% das amostras de *E. coli* isoladas de aves saudáveis. O gene fimC foi demonstrado em 90% das amostras APEC e em 27% das amostras isoladas

de hospedeiros saudáveis. Rodriguez-Siek et al. (2005b) encontraram o gene fimH em 98% das amostras APEC, e em 99% das amostras UPEC.

O papel da fímbria tipo 1 na infecção por APEC não está claro. Marc et al. (1998), usando mutantes com o operon fim deletado, mostraram que a expressão da fímbria tipo 1 não é necessária para a colonização da traquéia e sacos aéreos, não descartando seu envolvimento na colonização dos pulmões. A expressão da fímbria tipo 1 parece depender das condições ambientais, uma vez que é expressa na traquéia, pulmões e sacos aéreos, mas não é expressa em outros órgãos, e no sangue (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). A presença de outros fatores parece ser importante; Wooley et al. (1998) observaram que a colonização inicial pode requerer a presença de fímbria tipo 1, mas a colonização é mais eficiente quando APEC são móveis e produzem ColV, comprovando mais uma vez o caráter multifatorial das amostras APEC.

Fímbria tipo 1 também participa da interação de APEC com o sistema imune. Pourbakhsk et al. (1997b) mostraram que cepas virulentas são mais resistentes aos efeitos bactericidas dos macrófagos quando não expressam fímbria tipo 1. Outros autores tem mostrado que a fímbria tipo 1 está envolvida na fagocitose da bactéria pelos macrófagos, induzindo uma resposta imune através da ativação de mastócitos, liberação de histamina e TNF alfa e recrutamento de neutrófilos ao sítio de infecção (Marc et al., 1998). Mellata et al. (2003a e b) estudando amostras selvagens e mutantes, observaram a atuação da fímbria tipo 1 na associação com fagócitos e na manutenção da viabilidade da bactéria nesta associação, em contrapartida, não a detectaram na resistência sérica.

A expressão de fímbria tipo 1 aumenta a virulência de *E. coli* uropatogênica (UPEC), pois a adesina Fim H da fímbria tipo 1 pode mediar a invasão de UPEC nas células epiteliais da bexiga, por desencadear a cascata de sinalização das células do hospedeiro (Martinez et al., 2000). Boudeau et al. (2001) observaram que a aderência da fímbria tipo 1 tem papel fundamental na habilidade invasiva das amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com doença de Crohn, doença intestinal de caráter inflamatório e etiologia desconhecida.

Mais estudos são necessários para elucidar a participação da fímbria tipo 1 na virulência de APEC.

As fímbrias manose-resistentes (MR) compreendem um grupo heterogêneo de estruturas bacterianas que se ligam a carboidratos presentes nos receptores das células eucarióticas, diferentes da D-manose.

A fímbria tipo P é uma fímbria MR importante, que reconhece glicopeptídios contendo especificamente o dissacarídeo α -D-galactose (1-4) β -D-galactose (Källenius et al., 1980). Foi inicialmente encontrada em amostras de *E. coli* que causam infecções do trato urinário em humanos, é responsável pela aderência bacteriana às células uroepiteliais e está envolvida no desenvolvimento de pielonefrite (Johnson, 1991). Consiste de uma subunidade fimbrial maior denominada PapA e de adesina fimbrial terminal denominada PapG. Apresenta onze sorotipos, designados F7 a F16, sendo estes caracterizados através das diferenças antigênicas da proteína estrutural codificada pelo gene estrutural PapA (Hacker, 1992).

Algumas amostras de APEC também expressam fímbrias P, mas em baixa proporção (Dozois et al., 1992, 1995; Van Den Bosch et al., 1993; Vidotto et al., 1997; Bell et al., 2002). O operon Pap C foi detectado através da PCR somente em 14% das amostras APEC (Vidotto et al., 1997). Entretanto, a fímbria P, sorotipo F11, foi detectada em 78% das amostras, em vários sorotipos de amostras de APEC (de Ree et al., 1985; Van Den Bosch et al., 1993; Dozois et al., 1996), sendo mais freqüente nas amostras com sorotipos O1:K1, O2:K1, O78:K80 e sorogrupo O35 (Van Den Bosch et al., 1993).

O papel da fímbria P na patogenicidade de APEC não está bem elucidado. Esta adesina não parece estar envolvida na aderência às células da traquéia ou nasofaringe in vitro (Van Den Bosch et al., 1993; Vidotto et al., 1997). A expressão de fímbria P in vivo foi sugerida quando frangos inoculados com amostra APEC produtora de fímbria P-F11, via intra traqueal e sacos aéreos, produziram anticorpos anti F11 (Pourbakhsh et al., 1997c). Contudo, a amostra expressando esta fímbria colonizou sacos aéreos, pulmões e órgãos internos, mas não a traquéia em frangos inoculados, sugerindo a variação de fase para fímbria P, com respeito a sua localização, não mostrando atuação na colonização inicial, mas sim nos últimos estágios da infecção (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Algumas fímbrias não hemaglutinantes, como exemplo a fímbria designada AC/I (avian *E. coli* I), com 18 kDa, são descritas em amostras de *E. coli* aviária, sendo responsáveis pela adesão às células de traquéia, não aglutinando

qualquer dos tipos de eritrócitos testados (galinha, coelho, peru, cavalo, camundongo, cobaio e humano) na presença de manose (Yerushalmi et al., 1990), sua frequência, no entanto, é baixa (Delicato et al., 2003).

Adesinas fimbriais e não fimbriais, importantes em infecções causadas por *E. coli* em mamíferos, tem sido pesquisadas em APEC. Stordeur et al. (2002) analisando amostras isoladas de órgãos internos e intestinais de aves (galinhas, perus e patos) encontraram as adesinas AFA-VIII, F17, S e intimina (Eae), concluindo que estas podem representar fatores de colonização de algumas APEC, ao lado da bem descrita adesina fimbrial P.

Outros exemplos de adesinas bacterianas manose resistentes são os curli e a hemaglutinina temperatura-sensível (TSH). Curli são estruturas filamentosas finas e encaracoladas de aproximadamente 2nm de diâmetro encontradas na superfície bacteriana de *E. coli* e *Salmonella* spp. O papel da fímbria curli em infecções em aves por *E. coli* permanece não esclarecido, embora tenha sido demonstrado que in vitro elas medeiam ligação com fibronectina, laminina, plasminogênio, proteína ativadora de plasminogênio e colágeno tipo 1 (Olsen et al., 1989). Utilizando mutantes para a presença de curli foi observada maior adesão das amostras selvagens (curli+) que das mutantes (curli-) em diferentes tipos celulares (La Ragione et al., 2000).

A hemaglutinina temperatura sensível (Tsh) é responsável pela hemaglutinação manose resistente (MRHA) em eritrócitos de galinha, que ocorre quando a bactéria é cultivada a 26°C em meio de baixa osmolaridade, mas ocorre em culturas a 42°C e em anaerobiose. É codificada pelo gene tsh, que foi caracterizado pela primeira vez de APEC χ 7122 (O78:K80:H9), isolada de aves com aerosaculite e colissepticemia (Provence & Curtiss, 1992, 1994). O gene tsh está localizado em um plasmídio conjugativo associado à produção de colicina V, plasmídio este que frequentemente também carrega genes para o operon aerobactina (Dozois et al., 2000).

O gene tsh foi encontrado em alta frequência em amostras APEC (34% a 49,7%), mas não em isolados de *E. coli* a partir de fezes de aves saudáveis (Maurer et al., 1998; Dozois et al., 2000; Delicato et al. 2002). Rodriguez-Siek et al. (2005b) comparando os fatores de virulência presentes em APEC e UPEC, encontraram o gene tsh em 63% de APEC e 39,5% de UPEC. Heimer et al. (2004), analisando amostras humanas encontraram o gene tsh em 63% de UPEC e em 33%

de *E. coli* isolada de fezes. Esses dados demonstram que o gene *tsh* faz parte do conjunto de genes de virulência presentes em ExPEC.

As amostras de APEC possuem vários fatores de virulência associados (Vidotto et al., 1990). Delicato et al. (2003), estudando 200 amostras verificaram que o gene *tsh* é um dos 7 genes mais frequentes em APEC, e que outros genes são *iutA*, *iss*, *cvaC*, *papC*, *papG* e *felA*. Dados semelhantes foram obtidos por Ngeleka et al. (2002) e Rodriguez-Siek et al. (2005a), e esses autores sugeriram que este grupo de genes poderia ser útil na definição de patótipos de APEC.

Infecção experimental nos sacos aéreos utilizando linhagem selvagem ou mutante *tsh* isogênico demonstrou que *Tsh* contribui para o desenvolvimento das lesões nos sacos aéreos e deposição de fibrina, mas não está associado a infecções generalizadas como pericardite, perihepatite e septicemia, sugerindo a participação da *Tsh* nos estágios iniciais da colonização e infecção do trato respiratório (Dozois, et al., 2000).

Tsh não é um fator de virulência essencial, sendo possível a presença de adesinas alternativas substituindo-o (Tivendale et al., 2004), entretanto parece contribuir para a virulência de APEC. Dozois et al. (2000), estudando 300 amostras isoladas de aves, observaram que dentre as amostras *tsh* positivas, 90.6% foram classificadas como de alta patogenicidade; de Brito et al. (2003), observaram a presença do gene *tsh* em amostras de intermediária e alta patogenicidade, não sendo encontrado em amostras de baixa patogenicidade e não patogênicas.

Provence & Curtiss (1994), através da construção de uma biblioteca genômica de APEC, e pesquisa de mutantes originados pela inserção de transposon, isolaram e caracterizaram o gene *tsh*. Demonstraram que uma região de 4.4 Kb era requerida para hemaglutinação e após transcrição/tradução de proteína *in vitro* observaram que esta região codifica um polipeptídeo de aproximadamente 140 kDa, e pela análise da seqüência de DNA encontraram uma única fase aberta de leitura (ORF-open reading frame) de 4.134 nucleotídios, a qual codifica uma proteína com peso molecular deduzido de 148.226. Analisando a seqüência deduzida de aminoácidos desta proteína observaram significativa homologia com serinoproteases do tipo IgA1 produzidas por *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, as quais são secretadas para o espaço extracelular por um mecanismo altamente

eficiente e receberam a denominação de proteínas autotransporte (Henderson et al., 1998).

Tsh foi a primeira proteína autotransporte descrita em enterobactérias, caracterizando-se por ser uma serina protease que contém uma sequência de 7 aminoácidos altamente conservada, onde está presente o sítio ativo serina, GDSGSPL (Brenner, 1988), e que faz parte da família serina protease autotransporte de Enterobacteriaceae (SPATE - serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae) (Provence and Curtiss, 1994).

Proteína autotransporte é uma proteína secretada pelo sistema de secreção tipo V, o único em que não há gasto de energia e nem proteínas adicionais durante o processo de translocação (Stathopoulos et al., 2000).

Bactérias Gram negativas tem desenvolvido diversos sistemas de transporte para translocação de suas proteínas para a membrana externa ou ambiente extracelular, uma vez que possuem dois sistemas de membrana a serem ultrapassados, membrana citoplasmática, e a membrana externa, com o peptidoglicano e o espaço periplásmico entre elas, contrastando com as bactérias Gram positivas que possuem apenas a membrana citoplasmática, seguida por uma espessa peptidoglicana.

A proteína a ser secretada cruza a membrana citoplasmática de ambas, Gram negativas e positivas, normalmente envolvendo a via Sec-dependente. Contudo, uma vez cruzada a membrana citoplasmática, os destinos das proteínas translocadas divergem. Em bactérias Gram positivas, as proteínas são liberadas para o ambiente extracelular ou incorporadas à parede bacteriana. Em Gram negativas, resulta na liberação da proteína para o espaço periplásmico, e conseqüentemente, proteínas que são destinadas para a superfície da célula ou ambiente extracelular devem cruzar também a barreira adicional formada pela membrana externa. Para conseguir translocar estas proteínas para a superfície da célula e além dela, a bactéria gram negativa desenvolveu 5 mecanismos de secreção de proteínas (Henderson et al., 2004).

O protótipo da secreção tipo I é a secreção de alfa-hemolisina de *E. coli*, que ocorre de maneira sec-independente e em um processo contínuo que cruza as membranas interna e externa (Gentschev et al., 2002). As proteínas não são processadas durante a secreção e não formam intermediários no periplasma. Este sistema consiste de 3 proteínas: uma proteína de membrana externa formadora de

poros, uma proteína de fusão de membrana (MFP), e um grupo de proteínas (ABC) ligadas ao ATP na membrana interna. Na secreção da alfa-hemolisina, estas proteínas são representadas por TolC, HlyD e HlyB, respectivamente. O processo de secreção começa quando um sinal de secreção localizado no C-terminal final da molécula efetora secretada interage com a proteína transportadora ABC. Uma vez ligada à molécula efetora, a interação da HlyD(MFP) com a proteína de membrana externa TolC é ativada, seguido da secreção da molécula efetora para o meio externo. A ponte formada por MFP e proteína de membrana externa se desfaz depois da molécula efetora ser exportada. A hidrólise do ATP pelo transportador ABC fornece o impulso para guiar a secreção da molécula efetora pela parede da célula para o ambiente externo (Henderson et al., 2004).

A via de secreção tipo II é considerada a principal ramificação da via de secreção geral - GSP (general secretory pathway) sec-dependente. É exemplificada pela secreção da pullulanase de *Klebsiella oxytoca*, mas tem sido identificada em inúmeras outras espécies bacterianas que exportam uma gama de proteínas com diversas funções, inclusive a toxina da cólera e a exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*. A secreção ocorre em dois passos Sec-dependentes. A proteína secretada via secreção tipo II é sintetizada com uma sequência sinal N-terminal que direciona a proteína através da via de secreção pela membrana interna através da Sec. A maquinaria Sec é composta de ATPase, Sec A, várias proteínas integradas à membrana interna (SecD, SecE, SecF, SecG e SecY, e uma peptidase sinal). Sec B, uma chaperona citoplasmática, não reconhece a sequência sinal, mas reconhece a parte madura da proteína direcionada para secreção e subsequentemente dirige a proteína para o translocon Sec. SecA fornece energia para o transporte do translocon, e a peptidase sinal cliva a sequência sinal, liberando o resto da proteína para o periplasma, uma vez no periplasma a proteína restante adota um estado quase nativo que é facilitado por certas chaperonas como isomerases que ligam dissulfetos (DsbA). O transporte através da membrana externa requer 12 a 16 proteínas adicionais, dentre elas estão proteínas responsáveis pela interação espécie-específica definindo o transporte do substrato protéico, proteínas de membrana externa, quinases que regulam o processo de secreção por suprir energia para promover translocação, enfim, vários componentes que interagem para formar um complexo multiprotéico que atravessa a membrana interna e externa (Sandkvist, 2001; Henderson et al., 2004).

O sistema de secreção tipo III foi primeiro identificado em *Yersinia* spp na secreção de proteínas Yop, e posteriormente foi observado em muitos patógenos, incluindo *Salmonella* spp, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Pseudomonas syringae*, e *Chlamydia trachomatis*. Recentemente, tem sido objeto de considerável interesse devido ao seu papel primário na virulência destes patógenos. O mecanismo de secreção tipo III é altamente conservado, mas as moléculas transportadas são distintas e desenvolvem diferentes funções. Genes que codificam componentes requeridos para a secreção tipo III são geralmente localizados em um único plasmídeo ou locus cromossômico (Plano et al., 2001; Henderson et al., 2004).

Como no sistema de secreção tipo I, o sistema de secreção tipo III transloca suas moléculas efetoras através das membranas interna e externa, independente de Sec. Uma vez guiada para o lado citoplásmico, a secreção da molécula efetora pode ocorrer sem a formação de intermediários periplásmicos, pois ocorre através de uma estrutura semelhante a uma agulha que atravessa a membrana interna e externa, composta de 20 diferentes proteínas. Talvez a característica mais notável desta secreção seja sua habilidade para guiar as proteínas efetoras diretamente para a célula eucariótica. A analogia a uma seringa hipodérmica, junto com a habilidade do sistema de injetar proteínas diretamente dentro do citosol do hospedeiro, nomeou este sistema de secreção como injeção (Plano et al., 2001; Henderson et al., 2004).

O tipo IV (TFSS) é o menos conhecido das vias de secreção de Gram negativos. O sistema é relacionado com a maquinaria da conjugação bacteriana, sendo o protótipo o sistema de transferência da nucleo-proteína T-DNA do *Agrobacterium tumefaciens*. Contudo, já foi observado em *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, e *Helicobacter pylori*. *A. tumefaciens* secreta muitas moléculas efetoras (Vir D, Vir E e VirF) no citosol da célula hospedeira. Vir D é secretada como um complexo nucleoprotéico e a proteína permanece covalentemente ligada à copia do T-DNA fita simples. Uma vez no citosol, vir E interage com virD, mediando a entrega do T-DNA para o núcleo da célula do hospedeiro resultando na formação de tumor (Lai & Kado, 2000; Henderson et al., 2004).

O sistema de secreção de proteína tipo V, talvez seja o mais simples de todos. A primeira proteína autotransporte descrita foi uma IgA1 protease de *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987), e recebeu o nome de autotransporte,

pois ao contrário dos tipos I a IV, não há gasto de energia e fatores adicionais durante o processo de translocação.

A estrutura primária da proteína autotransporte consiste de 3 domínios: sequência amino terminal, domínio passageiro e beta-domínio. A sequência amino terminal (também chamada peptídeo líder) está presente na porção final N-terminal da proteína e permite guiar a proteína para a membrana interna visando sua exportação para o periplasma, que pode ocorrer através da via sec. O domínio passageiro, que possui diversas funções. O domínio localizado na porção final C-terminal da proteína, é a unidade de translocação (também chamada de Beta domínio), que consiste em uma estrutura curta com forma de beta barril quando embutida na membrana externa e facilita a translocação do domínio passageiro para a membrana externa (Henderson et al., 2004).

Após a passagem pela membrana interna através das proteínas Sec, o peptídeo sinal é clivado e a proteína liberada no periplasma. Durante o trânsito periplásmico é questionável a ocorrência de modificações estruturais. Em seguida, ocorre a translocação do domínio passageiro do periplasma para a superfície da célula, através do beta domínio, inserido na membrana externa como beta barril, com um poro hidrofílico central. Uma vez na superfície bacteriana, há caminhos alternativos, o domínio passageiro pode ser processado e libertado para o ambiente extracelular ou permanece em contato com a superfície bacteriana por interações não covalentes com o beta domínio. (Henderson et al., 2004).

A árvore filogenética das proteínas autotransporte, derivada da análise do domínio C-terminal, apresenta 11 grupos, sendo um deles o grupo da serina protease autotransporte de Enterobacteriaceae (SPATE) (Henderson et al., 2004). Membros da família SPATE são proteínas de *E. coli* e *Shigella* spp., que apesar de possuírem uma sequência de aminoácidos altamente conservada, onde está presente o sítio ativo serina, semelhante à IgA1 protease; não clivam IgA1, não foram encontradas em microrganismos não patogênicos, são de alto peso molecular e altamente imunogênicas (Henderson et al., 2004).

Tsh é uma proteína autotransporte sintetizada como uma proteína precursora de 140kDa, que durante a maturação sofre processos proteolíticos resultando em ao menos 2 proteínas, domínio C-terminal de 33kDa (resíduo 1101 a 1377 do precursor) que se insere na membrana externa, para mediar a translocação do domínio passageiro para o exterior da célula, e o domínio secretado de 106kDa

(resíduo 53 a 1100 do precursor). A presença da proteína precursora de 140kDa e do domínio C-terminal de 33kDa não foi confirmada em amostras selvagens (Stathopoulos et al., 1999).

Tsh se caracteriza por conferir o fenótipo de hemaglutinação em eritrócitos de galinha, quando a bactéria é cultivada a 26°C. Curiosamente, o aumento na temperatura de incubação, de 26°C para 37°C, levou a uma diminuição do título de hemaglutinação, mas a um aumento na expressão da proteína de 106 kDa. Também foi observado que somente células totais, e não o sobrenadante, foram capazes de conferir o fenótipo de hemaglutinação. Diante destes resultados, Stathopoulos et al. (1999) sugeriram que baixos níveis da proteína de 140 kDa estavam presentes e seriam responsáveis pela hemaglutinação. Os mesmos autores sugeriram ainda que a expressão da hemaglutinina Tsh, em baixas temperaturas, permitiria aderência ao trato respiratório durante contato inicial com o hospedeiro, enquanto a temperatura corpórea do hospedeiro levaria à expressão de adesinas ou outros fatores importantes na virulência, e reduziria a expressão do fenótipo de hemaglutinação.

Depois da descrição do Tsh, muitas proteínas SPATE tem sido identificadas, como por exemplo, SepA, uma proteína extracelular (Benjelloun-Touimi et al., 1995) e Pic, proteína envolvida na colonização intestinal em amostras de *Shigella* spp. (Henderson et al., 1999). SAT, uma toxina de *E. coli* uropatogênica (Guyer et al., 2000); EspC, proteína secretada por *E. coli* enteropatogênica (Stein et al., 1996); EspP proteína secretada por *E. coli* enterohemorrágica (Brunner et al., 1997) e Pet, toxina de *E. coli* enteroagregativa (Eslava et al., 1998), também pertencem ao grupo SPATE. Todas estas proteínas possuem alto nível de homologia, mas demonstram especificidade a substratos distintos (Dutta et al., 2002). Algumas das SPATEs, como EspC, EspP, Sat e Pet, tem sido reportadas como citotoxinas para diferentes tipos de células. EspC e Pet podem clivar espectrina, pepsina e fator V de coagulação humana. Pepsina e fator V da coagulação são também processados por EspP. Sat, por outro lado, cliva espectrina e fator V da coagulação humana. As proteínas Tsh e Pic tem sido descritas como as únicas SPATE capazes de clivar mucina, sendo esta capacidade importante para patógenos de mucosa (Dutta et al., 2002).

Kostakioti & Stathopoulos (2004) demonstraram que a Tsh_s purificada é capaz de se ligar a eritrócitos de carneiro, hemoglobina aviária, colágeno IV e

fibronectina, mas nenhuma ligação significativa foi detectada com mucina e laminina. Demonstraram também que Tsh_s é capaz de degradar caseína, sendo crítica a porção serina para atuação da proteína como protease. O sítio responsável pela aderência parece ser independente da porção serina, ou seja, as atividades proteolítica e de aderência pertencem à diferentes domínios da proteína.

A atividade proteolítica da proteína Tsh sobre os substratos mucina submaxilar de boi, caseína e fator V de coagulação sangüínea sintético (Dutta et al., 2002), indicam uma possível ação da Tsh sobre um número limitado de substrato específico. Mucinas são glicoproteínas presentes no muco epitelial de diversos sistemas, entre eles o sistema respiratório de aves. Devido à sua alta viscosidade, possuem papel fundamental na lubrificação e na proteção contra substâncias nocivas e infecciosas (Lillehoj & Kim, 2002; Kawakubo et al., 2004). A degradação completa ou parcial de moléculas de mucina por enzimas microbianas constitui o passo fundamental para a quebra de defesa da barreira mucosa. Inúmeros patógenos tem desenvolvido fatores de virulência, como mucinases, proteases ou glicosidases, para a degradação da barreira mucosa, ou simplesmente como fonte de nutrientes (Crowther et al., 1987; Dutta, et al., 2002; Aristoteli & Willcox, 2003; Robertson et al., 2005). Ainda não está claro o papel real da proteína Tsh na degradação da mucina no processo infeccioso, para tanto seria necessário caracterizar a expressão da proteína em amostras selvagens, avaliando as melhores condições ambientais para esta expressão.

Muitos métodos para avaliar a capacidade mucinolítica de uma bactéria foram descritos. Entre eles, incubação da bactéria ou da proteína em ágar contendo mucina e visualização da atividade mucinolítica após coloração com negro de amido, SDS-PAGE corado com reagente de Schiff (PAS) e cromatografia por exclusão de tamanho, utilizando bactéria ou proteína incubada com mucina, comparada à mucina não tratada (Henderson et al., 1999; Dutta et al., 2002., Aristoteli & Willcox, 2003). Uma vez que, nenhum desses métodos é capaz de avaliar a massa molecular da proteína envolvida no processo mucinolítico, nenhum deles poderá detectar a proteína mucinolítica em amostras selvagens.

Devido à elevada incidência da colibacilose, que acarreta perdas econômicas significativas, e a busca crescente por novas informações que auxiliariam no controle desta patologia na indústria avícola, o presente trabalho tem como objetivo a análise da expressão e a caracterização funcional da proteína autotransporte Tsh de *E. coli*.

2 OBJETIVOS

1. Análise do efeito da temperatura e dos meios de cultivo na expressão da hemaglutinina temperatura sensível (Tsh) em amostras selvagens de APEC.
2. Caracterização funcional das duas porções protéicas da proteína autotransporte Tsh em amostras selvagens de APEC.
3. Avaliação da capacidade mucinolítica da proteína Tsh frente à mucina de diferentes origens, inclusive mucina de traquéia de ave.
4. Determinação da massa molecular da proteína Tsh envolvida no processo mucinolítico.

3 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- A proteína Tsh em amostras selvagens de *E. coli* se apresenta predominantemente em duas formas, na forma de uma proteína de membrana externa (OMP) com 33kDa (Tsh_β) e na forma secretada com 106kDa (Tsh_s).
- A produção do Tsh_β é independente das condições ambientais (temperatura e meio de cultura), sendo expressa quando a bactéria foi cultivada em LB, CFA ou Mucina, à 26°C, 37°C ou 42°C. Em contrapartida, a produção do Tsh_s não ocorreu à 26°C, e foi expressa melhor quando a bactéria foi cultivada em presença de mucina.
- Tsh_β tem função hemaglutinante e Tsh_s tem função mucinolítica. A Tsh recombinante (r-Tsh) possui ambas as funções.
- A r-Tsh é capaz de degradar mucina de estômago de porco, glândula submaxilar de boi e de traquéia de ave.
- SDS PAGE copolimerizado com mucina é um método que possibilita avaliar a massa molecular da proteína envolvida no processo mucinolítico.

REFERÊNCIAS

- ARISTOTELI, L.P.; WILLCOX, M.D.P. Mucin degradation mechanisms by distinct *Pseudomonas aeruginosa* isolates in vitro. **Infect. Immun.**, v.71, p.5565-5575, 2003.
- BABAI, R.; STERN, B.E.; HACKER, J.; RON, E.Z. New fimbrial gene cluster of S-fimbrial adhesin family. **Infect. Immun.**, v.68, p.5901-5907, 2000.
- BELL, C.J.; FINLAY, D.A.; CLARKE, H.J.; TAYLOR, M.J.; BALL, H.J. Development of a sandwich ELISA and comparison with PCR for the detection of F11 and F165 fimbriated *Escherichia coli* isolates from septicemic disease in farm animals. **Vet. Microbiol.**, v.85, p.251-257, 2002.
- BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P.J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol. Microbiol.**, v.17, p.123-135, 1995.
- BOUDEAU, J.; BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v.39, p.1272-1284, 2001.
- BRENNER, S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. **Nature**, v.334, p.528-530, 1988.
- de BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. **Infect. Immun.**, v.71, p.4175-4177, 2003.
- BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.**, v.24, p.767-778, 1997.
- CLEGG, S.; GERLACH, G.G. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.**, v. 169, p.934-938, 1987.
- CROWTHER, R.S.; ROOMI, N.M.; FAHIM, R.E.; FORSTNER, J.F. *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. **Biochim. Biophys. Acta**, v.942, p.393-402, 1987.

DE REE, J.M.; SCHWILLENS, P.; VAN DEN BOSCH, J.F. Molecular cloning of F11 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli* and characterization of fimbriae with polyclonal and monoclonal antibodies. **FEMS Microbiol. Lett.** v.29, p. 91-97, 1985.

DELICATO, E.R.; de BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.46, p.594-601, 2002.

DELICATO, E.R.; de BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Vet. Microbiol.**, v.94, p.97-103, 2003.

DHO, M.; LAFONT, J.P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. **Avian Dis.**, v.26, p. 787-797, 1982.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Vet. Res.**, v.30, p.299-316, 1999.

DOZOIS, C. M.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; BOSSÉ, M. Pap and Pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infect. Immun.**; v.60, p.2648-2656, 1992.

DOZOIS, C.M.; POURBAKHS, S.A.; FAIRBROTHER, J.M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. **Vet. Microb.**, v.45, p. 297-309, 1995.

DOZOIS, C.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.M. P-fimbriae-producing septicemic *Escherichia coli* from poultry possess fel-related gene clusters whereas pap-hybridizing P-fimbriae-negative strains have partial or divergent P fimbrial gene clusters. **Microbiology**, v.142, p.2759-2766, 1996.

DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C.; CURTISS III, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. **Infect. Immun.**, v.68, p.4145-4154, 2000.

DUGUID, J.P.; OLD, D.S. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. **Recept. Recognit. Ser.**, v.B6, p.187-217, 1980.

DUTTA, P.R.; CAPELLO, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; NATARO, J. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v.70, p.7105-7113, 2002.

ESLAVA, C.E.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECHULIN, J.R.; HENDERSON, I.R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J.P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.66, p.3155-3163, 1998.

FINLAY, B.B.; COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v.276, p.718-725, 1997.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends Microbiol.**, v.10, p.39-45, 2002.

GROSS, W.B. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry. In: GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in Domestic Animals and Man**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.237-259.

GUYER, D.M.; HENDERSON, I.R.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v.38, p.53-66, 2000.

HACKER, J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.720-727, 1992.

HEIMER, S.R.; RASKO, D.A.; LOCKATELL, C.V.; JOHNSON, D.E.; MOBLEY, H.L.T. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v.72, p.593-597, 2004.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends in Microbiology**, v.6, p.370-378, 1998.

HENDERSON, I.R.; CZECHULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J.P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.67, p.5587-5596, 1999.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R.C.; ALDEEN, D.A. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.692-744, 2004.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

KÄLLENIUS, G.; MÖLLBY, R.; SVENSON, S.B.; WINBERG, J.; LUNDBLAD, A.; SVENSON, S. The p^k antigen as receptor o pyelonephritic *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.7, p.297-300, 1980.

KAWAKUBO, M.; ITO, Y.; OKIMURA, Y.; KOBAYASHI, M.; SAKURA, K.; KASAMA, S.; FUKUDA, M.N.; FUKUDA, M.; KATSUYAMA, T.; NAKAYAMA, J. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. **Science**, v.305, p.1003-1006, 2004.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v.72, p.5548-5554, 2004.

LA RAGIONE, R.M.; COOLEY, W.A.; WOODWARD, M.J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.327-338, 2000.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.27-35, 2002.

LAI E.M.; KADO, C.I. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. **Trends Microbiol.**, v.8, p.361-369, 2000.

LILLEHOJ, E.R.; KIM, K.C. Aiway mucus: its components and function. **Arch. Pharm. Res.**, v.25, p.770-780, 2002.

MARC, D.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DHO-MOULIN, M. Colonization ability and pathogenic properties of fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, v.149, p.473-485, 1998.

MARTINEZ, J.J.; MULVEY, M.A.; SCHILLING, J.D.; PINKNER, J.S.; HULTGREN, S.J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.**, v.19, p.2803-2812, 2000.

MAURER, J.J.; BROWN, T.P.; STEFFENS, W.L.; THAYER, S.G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.42, p.106-118, 1998.

McPEAKE, S.J.W.; SMYTH, J.A.; BALL, H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Vet. Microbiol.**, v.110, p.245-253, 2005.

MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C.M., CURTISS III, R., LEHOUX, B.; FAIRBROTHER, J.M. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. **Infect. Immun.** v.71, p.494-503, 2003a.

MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C.M., CURTISS III, R., BROWN, P.K., ARNÉ, P., BRÉE, A., DESAUTELS, C. & FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infect. Immun.** v.71, p.536-540, 2003b.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.66-73, 2005.

MORRIS, J.A. *Escherichia coli* fimbrial adhesins. **Pig News and Information**, v.4, n.1, p.19-21, 1983.

NAKAMURA, K.; COOK, J.K.; RAZIER, J. A.; NARITA M. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.36, p.881-890, 1992.

NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J.M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian Dis.**, v.46, p.143-152, 2002.

OLSEN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v.338, p.652-655, 1989.

PARRY, S.H.; ROOKE, D.M. Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **The virulence of *Escherichia coli***. Academic Press, 1985. p.79-155.

PFAFF-MCDONOUGH, S.J.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; EBERT, J.O.; DOTKOTT, C.; SMITH, M.H.; NOLAN, L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. **Avian Dis.**, v.44, p.23-33, 2000.

PLANO, G.V.; DAY, J.B.; FERRACI, F. Type III export: new uses for an old pathway. **Mol. Microbiol.**, v.40, p.284-293, 2001.

POHLNER, J.; HALTER, R.; BEYREUTHER, K.; MEYER, T.F. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. **Nature**, v.325, p.458-462, 1987.

POURBAKHS, S.A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZÉ, B.; DOZOIS, C.M., DESAUTELS, C., FAIRBROTHER, J.M. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. **Avian Dis.**, v.41, p. 221-233, 1997a.

POURBAKHS, S.A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZÉ, B.; FAIRBROTHER, J.M. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. **Vet. Microbiol.**, v.58, p. 195-213, 1997b.

POURBAKHS, S.A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE, B.; FAIRBROTHER, J.M. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v.22, p.331-341, 1997c.

PROVENCE, D.L.; CURTISS III, R. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. **Infect. Immun.**, v.60, p.4460-4467, 1992.

PROVENCE, D. L.; CURTISS III, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, v.62, p.1369-1380, 1994.

ROBERTON, A.M.; WIGGINS, R.; HORNER, P.J.; GREENWOOD, R.; CROWLEY, T.; FERNANDES, A.; BERRY, M.; CORFIELD, A.P. A novel bacterial mucinase, glycosulfatase, is associated with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.5504-5508, 2005.

RODRIGUES, V.S.; VIDOTTO, M.C.; FELIPE, I.; SANTOS, D.S.; GAZIRI, L.C.J. Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. **FEMS Letters**, 179/1, 1999.

RODRIGUEZ-SIEK, K.; GIDDINGS, C.W.; DOTKOTT, C.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Characterizing the APEC pathotype. **Vet. Res.**, v.36, p.241-256, 2005a.

RODRIGUEZ-SIEK, K.; GIDDINGS, C.W.; DOTKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v.151, p.2097-2110, 2005b.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.69, p.3523-3535, 2001.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D.L.; CURTISS III, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. **Infect. Immun.**, v.67, p.772-781, 1999.

STATHOPOULOS, C.; HENDRIXSON, D.R.; THANASSI, D.G.; HULTGREN, S.J.; ST. GEME III, J.W.; CURTISS III, R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. **Microbes and Infection**, v.2, p.1061-1072, 2000.

STEIN, M.; KENNY, B.; STEIN, M.A.; FINLAY, B.B. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. **J. Bacteriol.**, v.178, p.6546-6554, 1996.

STORDEUR, P.; MARLIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. **Vet. Microbiol.**, v. 84, p. 231-241, 2002.

TIVENDALE, K.A.; ALLEN, J.L.; GINNS, C.A.; CRABB, B.S.; BROWNING, G.F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.72, p.6554-6560, 2004.

VAN DEN BOSCH, J.; HENDRIKS, J.H.I.M.; GLADIGAU, I.; WILLENS, H.M.C.; STORM, P.K.; DE GRAAF, F.K. Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v.61, p.800-806, 1993.

VIDOTTO, M.C.; MÜLLER, E.E.; de FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G.; SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v.34, p.531-538, 1990.

VIDOTTO, M.C.; NAVARRO, H.R.; GAZIRI, L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.**, v.59, p.79-87, 1997.

WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; BROWN, T.P.; GLISSON, J.R.; STEFFENS, W.L.; MAURER, J.J. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11., **Avian diseases**, v.42, p.194-199, 1998.

YERUSHALMI, Z.; SMORODINSKY, N.I.; NAVEH, M.W.; RON, E.Z. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O7. **Infect. Immun.** v.58, p.1129-1131, 1990.

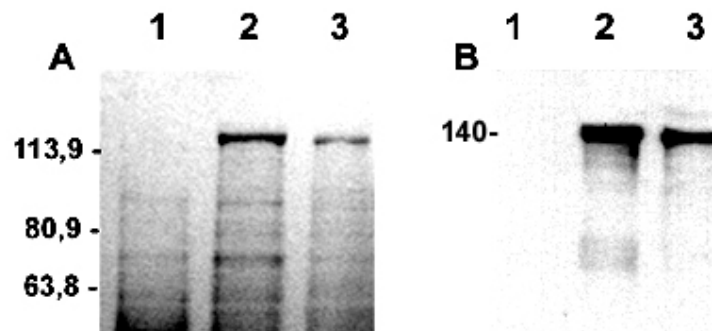


Fig.1. Expression of the 140 kDa protein by clone *E. coli*/pET101-*tsh* and immunological response of this protein in chickens. (A) SDS-PAGE 8% stained with Coomassie brilliant blue. (B) Western blot with anti-Tsh antibody and anti-chicken IgG conjugated with peroxidase. Lane 1, *E. coli* BL21; lane 2, clone BL21/pET101-*tsh* induced with IPTG 1mM; lane 3, eluted Tsh. The band of approximately 140 kDa corresponds to Tsh protein.

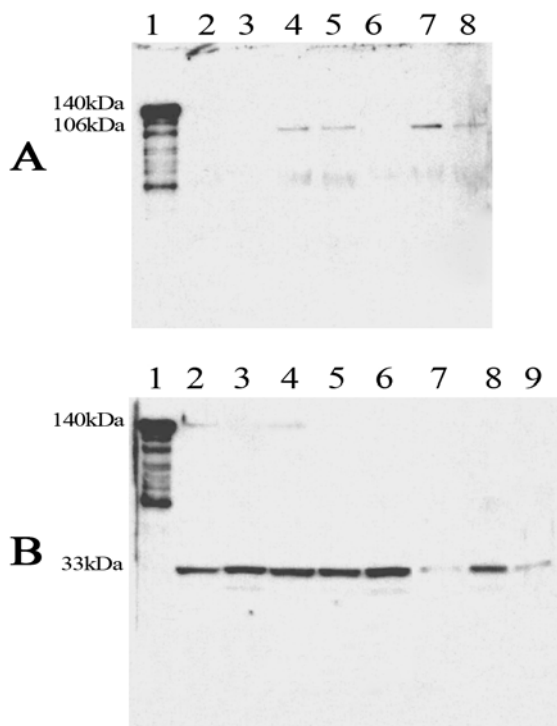


Fig. 2. Western blot of fractions from APEC 13 grown under different media and temperatures. (A) Supernatant fractions, lanes (1) as control, recombinant *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh*; (2) LB medium, 26°C; (3) CFA, 26°C; (4) CFA, 37°C; (5) CFA, 42°C; (6) Mucin, 26°C; (7) Mucin, 37°C; (8) Mucin, 42°C. (B) Pellet fractions, lanes (1) *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh*; (2) LB, 26°C; (3) LB, 42°C; (4) CFA, 26°C; (5) CFA, 37°C; (6) CFA, 42°C; (7) Mucin, 26°C; (8) Mucin, 37°C; (9) Mucin, 42°C. The positions of molecular mass markers (kDa) are shown at the left.

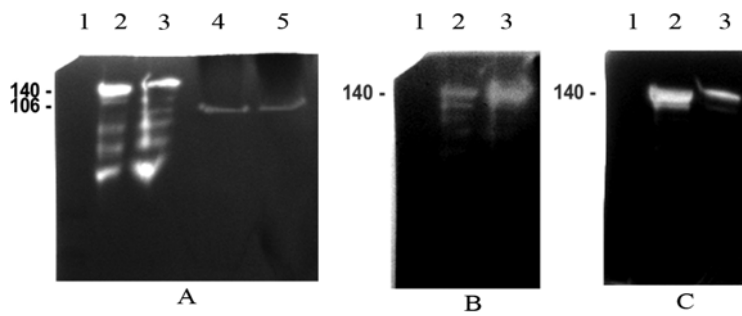


Fig. 3. Mucinolytic activity of the Tsh protein, evidenced on gels containing added mucins as substrates. (A) Bovine submaxillary mucin; (B) chicken tracheal mucus; (C) Porcine Gastric Mucin; Lanes (1) pellet from *E. coli* BL 21 StarTM (DE3); (2) pellet from recombinant *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh*; (3) purified r-TSH protein; (4) lyophilized supernatant from APEC 13 grow in mucin broth at 37°C; (5) concentrated supernatant from APEC 13 grown in mucin broth at 37°C. The positions of molecular mass markers are indicated at the left.

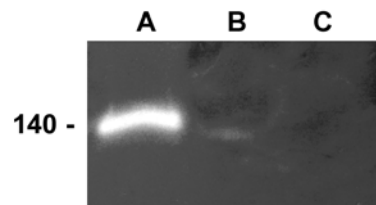


Fig.4. Inhibition of mucinolytic activity of the Tsh protein by anti-Tsh antibody. Lanes A: purified r-TSH protein; B: purified r-TSH protein incubated with 5 µl of anti-Tsh; C: purified r-TSH protein incubated with 10 µl of anti-Tsh. The positions of molecular mass markers are indicated at the left.

ANEXOS

ANEXO 1

**ARTIGO1: EXPRESSION, HEMAGGLUTINATING AND MUCINOLYTIC ACTIVITIES
OF THE TSH PROTEIN FROM AN AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA
COLI* (APEC) STRAIN**

Expression, hemagglutinating and mucinolytic activities of the Tsh protein from an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain

Authors: Renata K. T. Kobayashi, Luis Carlos J. Gaziri and Marilda C. Vidotto*

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, Caixa postal 6001, 86051-970 Londrina, Paraná, Brazil.

Key Words: Avian *Escherichia coli*, temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh), virulence factor, functional characterization

***Universidade Estadual de Londrina, Depto de Microbiologia - CCB**

Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-970 – Londrina, Pr- Brazil.

Fone: 55- 021 43 3371 4396. Fax: 55- 021 43 33274207

Email:macarlos@uel.br

Abstract

The temperature sensitive hemagglutinin (Tsh) expressed by strains of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) has both agglutinin and protease activities. Tsh is synthesized as a 140 kDa precursor protein, whose processing results in a 106 kDa passenger domain (Tsh_s) and a 33 kDa β -domain (Tsh _{β}). Both r-Tsh (140 kDa) and pellets from wild APEC13, which contain Tsh _{β} (33 kDa), agglutinated chicken erythrocytes. Both r-Tsh and supernatants from APEC13, which contain Tsh_s (106 kDa), caused proteolysis of chicken tracheal mucins. Chicken anti-Tsh serum inhibited the hemagglutinating activity of strains APEC13 and recombinant *E. coli* BL21/pET101-*tsh*, and it also inhibited the mucinolytic activity of Tsh protein.

1 Introduction

The temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) expressed by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) confers the phenotype mannose-resistant hemagglutination (MRHA) of chicken erythrocytes to bacteria grown at 26°C on low-osmolarity solid medium (Provence and Curtiss, 1992, 1994). The *tsh* gene was detected in APEC, but not in *E. coli* isolated from the faeces of healthy chickens, which suggests that it possibly has a role in the pathogenicity of APEC (Maurer *et al.*, 1998; Dozois *et al.*, 2000). The deduced sequence of 4.4 kb of Tsh presented homology to the serine-type immunoglobulin A (IgA) proteases of *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* (Provence and Curtiss, 1994), and as Tsh is secreted similarly to type IgA serine-proteases, it was classified into the subfamily of autotransporter proteins denominated “SPATE” (“serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*”) (Henderson *et al.*, 1998; Stathopoulos *et al.*, 1999; Dozois *et al.* 2000).

Maturation of Tsh produces two proteins, a 106 kDa extracellular protein (Tsh_s), and a 33 kDa outer membrane protein (Tsh _{β}). The 106 kDa protein contains the serine-protease motif, which is also found in secreted IgA proteases, but it did not cleave human IgA, or chicken IgA (Stathopoulos *et al.*, 1999), although Tsh did cleave bovine submaxillary gland mucin and coagulation factor V (Dutta *et al.*, 2002). Tsh_s adheres to red blood cells, hemoglobin, and the extracellular matrix proteins fibronectin and collagen IV, but does not adhere to mucin. It was also demonstrated that Tsh_s exerts proteolytic activity against casein (Kostakioti & Stathopoulos, 2004).

APEC isolated in Brazil often carry the *tsh* gene (Delicato *et al.*, 2002), whereas non-pathogenic strains do not carry it, which strengthens the contention that it is an important

virulence factor and a possible target for vaccine development. We previously cloned the *tsh* gene (R. C. Simões, R. K. T. Kobayashi, L. C. J. Gaziri, and M. C. Vidotto, submitted for publication), and in this study we investigated expression and functional characteristics of Tsh from a Brazilian isolate of APEC.

2 Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions

APEC 13 strain, serotype O2: H9; APEC 27 strain, serotype O36:H35; APEC 35, serotype O153:H17 (Moura et al., 2001) were isolated from colibacillosis lesions. The *E. coli* BL 21 StarTM (DE3) strain (Invitrogen) was used as receptor of recombinant plasmid pET 101-*tsh*, which allows high-level expression of T7-regulated genes. The strains *E. coli* BL21 StarTM(DE3) and *E. coli* HB101 were used as negative controls.

Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar; *E. coli* BL21 Star(DE3)/*tsh* was grown in media containing added ampicillin (100µg/ml). The wild strain APEC 13 was grown in agar colonization factor antigen (CFA), and in agar mucine (10ml 5XM9; 0.5g Porcine Gastric Mucin - PGM, Type III; Sigma, St Louis, Mo.; 1g agar; 50ml dH₂O). Mucin solutions were previously autoclaved at 121°C for 15 min. Strains grown in broth were cytospun (5000 rpm, 10 min., 4°C), the pellet was frozen, and the supernatant was filtered and lyophilized. Strains grown in agar were suspended in 2 ml of 0.85% NaCl, spun (14000 rpm, 40 min., 4°C), the pellet was frozen, and the supernatant filtered (0.8µm and 0.45µm Millipore filters).

TSH protein purification

The strain *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh* was grown in 50ml of LB broth, at 37°C, and 1mM of IPTG (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) was added when the culture reached OD₆₀₀ equal to 0.6, followed by further 4h of incubation. The protein was purified, as directed by the manufacturers of ProBond (Invitrogen).

Antibody production and purification

The purified r-Tsh protein (100µg) was resolved by SDS-PAGE (8% gels), the 140kDa protein was removed and intramuscularly inoculated together with Freund's adjuvant into chickens. Four days after the second boost, chickens were bled, and the serum was separated,

inactivated, and adsorbed on E. coli BL 21 StarTM (DE3). Control sera were obtained from non-immunised chickens.

Analysis of Tsh by SDS PAGE and Western Blotting

Cell lysates and purified protein were suspended in electrophoresis sample buffer (0.025M Tris-HCl, 2% SDS, 15% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, pH 6.8), boiled for 5 min, and electrophoresed on SDS 5-12% polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Gels were either stained with Comassie blue or set up for Western blot. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Pharmacia Biotech) and the membranes were blocked in blocking buffer (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% nonfat dry milk) for 1 h at room temperature under agitation. The membranes were washed in PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20) and incubated for 1 h in a 1:40000 dilution of serum Anti-Tsh. The membranes were then washed and the protein Tsh was detected by means of enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting System (Amersham International, Amersham, United Kingdom). Protein molecular weight markers (BenchMarkTM Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) were used as standards.

To verify the location of the Tsh protein, APEC 13 strain was grown on CFA broth at 26°C to induce Tsh protein synthesis. The OMPs were purified as previously described (Griffiths et al., 1983) and analysed by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membrane for Western blotting.

Hemagglutination assay

Hemagglutination activity was tested by microhemagglutination (Provence and Curtiss, 1992). Bacteria grown on CFA (colonisation factor antigen) agar plates at 26 °C for 48 h were harvested and suspended in 0.85% NaCl. When cells were assayed for hemagglutination activity, the suspension of cells was serially diluted in 0.85% NaCl containing methyl- α -D-mannopyranoside (1%) (Sigma, St. Louis, USA) to inhibit hemagglutination by type1 fimbriae and then was added to each well of a 96-well round-bottom microplate containing a suspension of fresh chicken erythrocytes. The reactions were incubated for 1 h on ice. Wells containing an even sheet of erythrocytes across the well were considered positive, whereas those containing a small erythrocyte pellet at the bottom of the well were considered negative. To test the presence of inhibitory antibodies in the immune serum, APEC 13, BL21/pET101-*tsh* and BL21 strains were incubated with anti-Tsh serum and control serum for 30 min on ice, and then tested by the micro-hemagglutination assay.

Extraction of mucine from chicken trachea

Chicken tracheal mucin was obtained from 10 bled roosters. Their tracheas were removed under aseptic conditions, slit lengthwise, and their mucus collected by gently scraping the surface with a sterile spatula. The mucus was homogenized, filtered, concentrated on Centriprep® YM-10 Centrifugal Filter Units (Millipore), and further filtered on 0.45µm filters (Millipore). Samples of this preparation were plated on LB agar to test for bacterial contamination. Protein content was assayed by Lowry's method (Miller, 1959).

Assay of Tsh mucinase activity

Polyacrylamide gels (8%) copolymerized with 10mg (1.25mg/ml) of mucin were used to assay the mucinase activity of r-Tsh protein and cellular preparations. Porcine gastric mucin (Type III; Sigma, St Louis, Mo.), bovine submaxillary mucin (Type I, Sigma Chemical Co.), and chicken tracheal mucin preparation were used as substrates.

After electrophoresis, the gels were treated with 1% Triton X-100 for 1h, rinsed, and incubated for 40h in mucinase buffer (0.05M Tris-HCl, pH 8.0; 0.01M CaCl₂; 0.15M NaCl). The gel was then fixed, rinsed for 24h in several solutions of isopropanol and acetic acid, and stained by Schiff's periodic acid technique. Inhibition of the mucinolytic activity was tested by incubation of 5 µl or 10 µl anti-Tsh antibody (42mg/ml) with 10 µl of Tsh (67µg/ml) for 30min at room temperature.

Proteolytic activity of APEC 13 was also tested in agar plates containing either albumin, or casein, or mucin, which were incubated for 24h at 37°C and stained with amido black.

3 Results

Purification of recombinant Tsh protein and localization of Tsh protein on APEC

Expression and purification of Tsh was tested on recombinant *E. coli* BL21/pET 101-*tsh* and APEC 13, in the supernatants and pellets of strains grown in several media and at different temperatures.

The profile of bands on SDS-PAGE shows the presence of induced Tsh (Fig. 1A, lane 2) by comparison with strain *E. coli* BL21 (Fig. 1A, lane 1). The recombinant Tsh (r-Tsh) was effectively purified from resin ProBond and presents approximately 140 kDa (Fig. 1A, lane 3). The reactivity of r-Tsh with the anti-Tsh serum on Western blot is shown on lane (Fig 1B, lanes 2 and 3).

The anti-Tsh antibody also recognized, by Western blot, a 106 kDa protein in the supernatants from APEC 13 culture (Fig. 2A) and a 33 kDa protein in the pellet from APEC13 (Fig. 2B). Extracts of outer membrane proteins (OMP) of APEC 13 also presented the 33 kDa protein that reacted with anti-Tsh antibody.

Supernatants from APEC 13 cultures presented a protein of about 106 kDa when the bacteria were grown at either 37°C or 42°C in CFA agar (Fig. 2 A, lane 4 and 5), although this protein was more evident when the bacteria were grown at 37°C in mucin agar (Fig 2A, lane 7). This 106 kDa protein was not detected when the bacteria were grown at 26°C in any of the culture media used in this study (Fig.2A, lane 2 and 3). A 106 kDa protein was also detected in the supernatants when the bacteria were grown in mucin broth at 37°C for 48h. The 140 kDa protein was not found in the supernatants from APEC 13 cultures. Supernatants from APEC 27 and APEC 35 also presented the 106 kDa protein when grown at 37°C in mucine-agar, and the 33 kDa protein in the pellet, when grown at 26°C in CFA.agar.

Pellets from APEC 13 cultures presented a protein of about 140 kDa, when the bacteria were grown at 26°C in LB agar or CFA agar (Fig. 2 B, lanes 2 e 4). When the bacteria were grown in either LB agar, CFA agar, or mucin agar, at either 26°C, 37°C, or 42°C, the culture pellets also presented a 33 kDa protein. Pellets from cultures of bacteria grown in liquid medium presented proteins of about the same relative molecular masses as those detected after growth in agar.

Tsh hemagglutinating activity

Both the recombinant *E. coli* BL21/pET 101-tsh and APEC13 agglutinated chicken erythrocytes, and this hemagglutination was inhibited by the anti-Tsh antibody, whereas the BL21 strain (tsh⁻) was non-agglutinating, indicating that pET101-tsh contains the structural gene that codifies the hemagglutinin Tsh. Supernatants from APEC 13 cultures grown in CFA broth at 37°C did not cause hemagglutination. OMP extracts from APEC 13 grown at either 26°C or 37°C caused hemagglutination, which was inhibited by the anti-Tsh antibody. The 140 kDa purified r-Tsh protein caused agglutination of chicken erythrocytes, which was inhibited by the anti-Tsh antibody.

Tsh mucinolytic activity

Both the recombinant *E. coli* BL21/pET 101-tsh and the protein r-Tsh cleaved bovine submaxillary mucin (Fig. 3A, lanes 2 and 3), chicken tracheal mucin (Fig 3B, lanes 2 and 3) and

pig gastric mucin (Fig. 3C, lanes 2 and 3). The wild strain BL21 did not cleave any of those mucins (Fig. 3A, B, C; lane 1).

Concentrated supernatants from APEC 13 cultures presented mucinolytic activity (Fig. 3A, lane 4 and 5), whereas its pellets did not present mucinolytic activity (picture not shown). A clear halo of protein degradation was observed around colonies of APEC 13 grown in agar mucine; this was not observed when the bacteria were grown in either albumin agar or casein agar, nor when it was grown in mucin agar supplemented with glucose (pictures not shown).

The anti-Tsh antibody also inhibited the mucinolytic activity of Tsh recombinant protein (Fig.4).

4 Discussion

Chicken anti-Tsh sera recognized r-Tsh protein, but did not recognize any protein from recipient strain *E. coli* BL21, showing that it was highly specific for Tsh. This sera recognized a 106 kDa protein in supernatants from APEC 13 grown at 37°C and a 33 kDa in the culture pellets, showing that the 140 kDa protein was cleaved into those smaller proteins. This conclusion is corroborated by the observation that supernatants from APEC 13 cultures grown at 37°C did not contain detectable 140 kDa protein, whereas the pellets from cultures grown at 26°C did contain the 140 kDa protein. Thus, those observations suggest that wild APEC 13 processes Tsh in a temperature dependent way which parallels the original findings in recombinant *E. coli* K-12 (Provence and Curtiss III, 1994; Stathopoulos et al., 1999)

Purified r-Tsh agglutinated chicken erythrocytes, and this agglutination was inhibited by anti-Tsh antibody, showing that in aqueous solution the 140 kDa Tsh carries an active agglutinin domain. Since supernatants from APEC 13 cultures, which contain the 106 kDa protein, but do not contain the 140 kDa protein, did not cause hemagglutination, whereas OMP extracts of bacteria grown at either 26°C or 37°C, which contain the 33 kDa protein, did cause agglutination, it seems that APEC directed proteolysis of the 140 kDa protein occurred at both growth temperatures. However, an alternative interpretation of these data cannot be excluded. Since APEC 13 cells grown at 26°C caused hemagglutination and presented the 140 kDa protein, whereas their supernatants did not contain detectable amounts of 106 kDa protein, and given that purified r-Tsh caused agglutination, it is also possible that agglutination caused by cells grown at 26°C was due to native membrane-bound 140 kDa protein, and that the presence of the 33 kDa protein in their OMP extracts was caused by cleavage during cell disruption and membrane pelleting procedures. This latter alternative implies that APEC directed release of Tsh_s occurs

preferentially at 37°C, and not at 26°C, which could represent an interesting adaptation to release proteolytic activity in a medium where it would be useful for bacterial growth.

Both r-Tsh protein and supernatants from APEC 13 cultures (which contain the 106 kDa protein) presented mucinolytic activity. APEC 13 grown in agar mucine also presented proteolytic activity, which was not observed when the bacteria were grown in some other agar protein media or in mucine-agar supplemented with glucose. This suggests that the mucinolytic activity of Tsh might be important for the colonization of the avian tracheal mucous environment by APEC.

Acknowledgments

This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and “Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior” (CAPES).

References

1. Delicato ER, Brito BG, Konopatzki AP, Gaziri LC, Vidotto MC (2002) Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 46: 713-716.
2. Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res* 30: 299-316.
3. Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss III R (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect. Immun.* 68: 4145-4154.
4. Dutta PR, Capello R, Navarro-García F, Nataro JP (2002) Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun* 70: 7105-7113.
5. Griffiths, E.; Stevenson, P.; Joyce, P. Pathogenic *Escherichia coli* express new outer membrane proteins when growing in vivo. *FEMS Microbiology Letters*, 16:95-99, 1983
6. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great scape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6: 370-378.
7. Kostakioti M, Stathopoulos C (2004) Functional analysis of the Tsh autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect Immun.* 72: 5548–5554.

8. Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG (1998) The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*: 42, 106-118.
9. Miller GL Protein determination for large numbers of samples (1959). *Analytical Chemistry*, 31: 964.
10. Moura AC, Irino K, Vidotto MC (2001) Genetic Variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Dis*. 45: 173-181.
11. Provence DL, Curtiss III, R (1992) Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding or curli production. *Infect. Immun* 60: 4460-4467.
12. Provence DL & Curtiss III R (1994) Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun* 62: 1369-1380.
13. Stathopoulos, C., Provence, D., Curtiss III, R., 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect. Immun*. 67, 772-781.

ANEXO 2

**ARTIGO 2: DETECTION OF TSH PROTEIN MUCINOLYTIC ACTIVITY BY SDS
PAGE**

Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS PAGE

Authors: Renata K. T. Kobayashi, Luis Carlos J. Gaziri and Marilda C. Vidotto

***Universidade Estadual de Londrina, Depto de Microbiologia - CCB
Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-970 – Londrina, Pr- Brazil.
Fone: 55- 021 43 3371 4396. Fax: 55- 021 43 33274207
Email: kobayashirkt@uel.br**

Abstract

Mucins are glycoproteins present in epithelial mucous secretions, which exert a protective function due to their high viscosity. Some bacteria produce mucinolytic proteins, such as the temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) secreted by *Escherichia coli*. In this work we detected the mucinolytic activity of Tsh by SDS-PAGE in gels containing mucins as substrates.

Mucus is a thick secretion that coats many epithelial surfaces (oral cavity, respiratory tract, eyes, gastrointestinal tract, bladder and cervix); it is mainly composed by glycoproteins termed mucins. Mucins plays an important role in animal and human health, as it lubricates those epithelial surfaces and protects them against noxious substances and infections (Lillehoj and Kim, 2002; Kawakubo et al., 2004). Partial or complete degradation of mucin molecules by microbial enzymes is often a fundamental step in disruption of defensive mucosal barriers. Microbial pathogens developed virulence mechanisms, such as mucinases, proteases and glycosidases that disrupt the mucin barrier (Crowther et al., 1987; Dutta et al., 2002; Aristoteli and Willcox, 2003; Robertson et al., 2005).

The temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) is a bi-functional protein with both adhesive and proteolytic properties, which is secreted by some pathogenic strains of *Escherichia coli*. Native Tsh (140 kDa) is cleaved into a 33 kDa outer membrane and a 106 kDa extracellular protein (Provence & Curtiss, 1992, 1994; Stathopoulos et al., 1999; Dutta et al., 2002; Kostakioti and Stathopoulos, 2004). Since methods currently used for the detection of mucinolytic activity (Henderson et al., 1999; Dutta et al., 2002; Aristoteli & Willcox, 2003) do not allow immediate evaluation of the molecular mass of the proteolytic Tsh fragment, in this study we characterized the mucinolytic fragment by SDS-PAGE in gels containing diverse mucins as substrates.

Strain *E. coli* BL21 Star (DE3)/*tsh* recipient of the recombinant plasmid pET 101-*tsh* was used for expression of the Tsh protein (R. C. Simões, R. K. T. Kobayashi, L. C. J. Gaziri, and M. C. Vidotto, submitted for publication). The wild strain APEC13, serotype O2:H9 harboring *tsh* gene, and strain *E. coli* BL21 StarTM(DE3) were used as controls.

The strain *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh* was grown in Luria-Bertani (LB) broth containing added ampicillin (100µg/ml), at 37°C, and induced by the addition of IPTG (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). The protein was purified, as directed by the manufacturers of ProBond (Invitrogen). The wild strain APEC 13 was grown in mucin broth (10ml 5XM9; 0.5g Porcine Gastric Mucin - PGM, Type III; Sigma, St Louis, Mo.; 50ml dH₂O).

Mucin solutions were previously autoclaved at 121°C for 15 min. (Aristoteli and Willcox, 2003). Samples were cytospun (5000 rpm, 10 min., 4°C), the pellet was frozen, and the supernatant was filtered and lyophilized.

To test Tsh mucinolytic activity, porcine gastric mucin (Type III; Sigma, St Louis, Mo.), bovine submaxillary mucin (Type I, Sigma Chemical Co.), and chicken tracheal mucin preparation were used as substrates. Chicken tracheal mucin was obtained from 10 bled roosters. Their tracheas were removed under aseptic conditions, slit lengthwise, and their mucus collected by gently scraping the surface with a sterile spatula. The mucus was homogenized, filtered, concentrated on Centriprep® YM-10 Centrifugal Filter Units (Millipore), and further filtered on 0.45µm filters (Millipore). Samples of this preparation were plated on LB agar to test for bacterial contamination. Protein content was assayed by Lowry's method.

The polyacrylamide gels (8%) copolymerized with 10mg (1.25mg/ml) of mucin were treated with 1% Triton X-100 for 1h, rinsed, and incubated for 40h in mucinase buffer (0.05M Tris-HCl, pH 8.0; 0.01M CaCl₂; 0.15M NaCl). The gel was then fixed and rinsed in solution containing isopropanol 25% and acetic acid 10% for 2h, isopropanol 10% and acetic acid 10% for 12h and lastly, acetic acid for 10h with several washings. The gel was stained by Schiff's periodic acid technique; the coloration phase was started by the oxidation with periodic acid 1% and acetic acid 3% for 1h. The gel was washed 6 times, each washing with distilled water lasting 10min, and placed into Schiff reagent, protected from light for 50 min, then bleached with sodium metabisulphite 0.5% and visualized.

Inhibition of the mucinolytic activity was tested by incubation of 5µl anti-Tsh antibody (42 mg/ml) with 10µl of Tsh (67µg/ml) for 30 min at room temperature.

Both the recombinant *E. coli* BL21/pET 101-*tsh* and the protein r-Tsh cleaved bovine submaxillary mucin (Fig. 1A, lines 2 and 3), chicken tracheal mucin (Fig 1B, lines 2 and 3) and pig gastric mucin (Fig. 1C, lines 2 and 3). The wild strain BL21 did not cleave any of those mucins (Fig. 1A, B, C; line 1). The gel allowed detection of 0.5µg of mucinolytic protein. The anti-Tsh antibody inhibited the mucinolytic activity of Tsh recombinant protein (Fig. 2).

Concentrated supernatants from APEC 13 cultures, which contain the secreted 106 kDa protein, presented mucinolytic activity (Fig. 1A, lines 4 and 5).

Tsh has currently received great attention, both for its bi-functional characteristics and for its potential as a target for the development of a vaccine against colibacillosis (Stewart-

Tull et al, 2004), which is a disease that causes important worldwide economic losses to the poultry industry. In this study we developed a simple and fast method that allows direct detection of the mucinolytic activity of r-Tsh (140 kDa) and of its secreted portion (106 kDa), which could be useful in the preparative steps of further Tsh studies.

References

- Aristoteli, L. P., and Willcox, M.D. P., 2003. Mucin degradation mechanisms by distinct *Pseudomonas aeruginosa* isolates in vitro. *Infect. Immun.* 71, 5565-5575.
- Crowther, R., Roomi, N., Fahim, R., Forstner, J., 1987. *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 942, 393-402.
- Dutta, P. R., Cappello, R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P., 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* 70, 7105-7113.
- Henderson, I.R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., Nataro, J., 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67, 5587-5596.
- Kawakubo, M., Ito, Y., Okimura, Y., Kobayashi, M., Sakura, K., Kasama, S., Fukuda, M.N., Fukuda, M., Katsuyama, T., Nakayama, J., 2004. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science.* 305, 1003-1006.
- Kostakioti, M., Stathopoulos, C., 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect Immun.* 72, 5548–5554.
- Lillehoj, E. R. and Kim, K.C., 2002. Airway mucus: its components and function. *Arch. Pharm. Res.* 25(6), 770-780.
- Provence, D. L., and Curtiss III, R., 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding or curli production. *Infect. Immun.* 60, 4460-4467.
- Provence, D. L., and Curtiss III, R., 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* 62, 1369-1380.
- Robertson, A. M., Wiggins, R., Horner, P.J., Greenwood, R., Crowley, T., Fernandes, A., Berry, M., Corfield, A. P., 2005. A novel bacterial mucinase, glycosulfatase, is associated with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 43(11), 5504-5508.

- Stathopoulos, C., Provence, D. L., Curtiss III, R., 1999. Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A Protease-Type Family of Autotransporters. *Infect. Immun.* 67, 722-781.
- Stewart-Tull, D.E.S., Lucas, C., Bleakley, C.R., 2004. Experimental immunisation and protection of guinea pigs with *Vibrio cholerae* toxoid and mucinases, neuraminidase and proteinase. *Vaccine.* 22(17-18), 2137-2145.

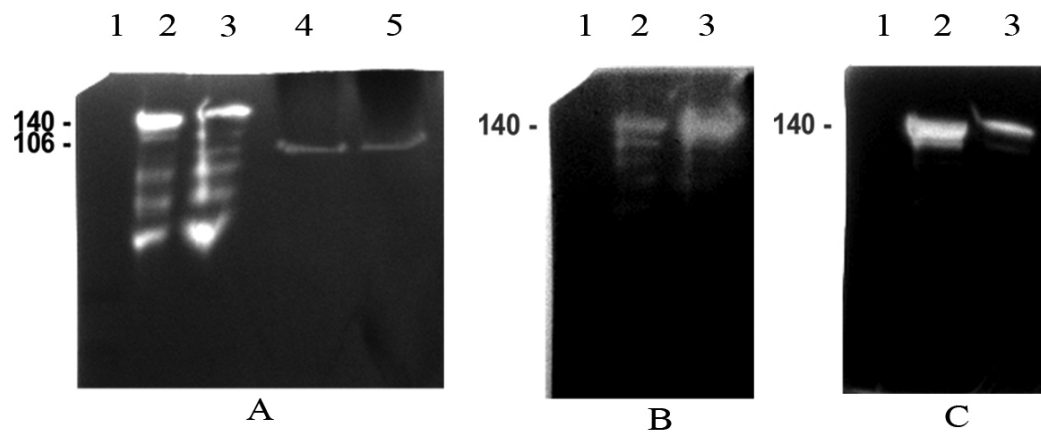


Fig. 1. Mucinolytic activity of the Tsh protein, evidenced on gels containing added mucins as substrates. (A) Bovine submaxillary mucin; (B) chicken tracheal mucus; (C) Porcine Gastric Mucin. Lanes (1) pellet from *E. coli* BL 21 StarTM (DE3); (2) pellet from recombinant *E. coli* BL 21 StarTM (DE3)/*tsh*; (3) purified r-TSH protein; (4) lyophilized supernatant from APEC 13 grown in mucin broth at 37°C; (5) concentrated supernatant from APEC 13 grown in mucin broth at 37°C. The positions of molecular mass markers are indicated at the left.

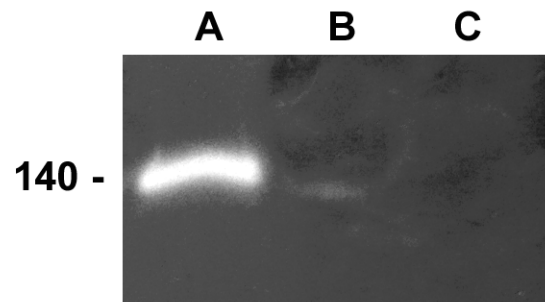


Fig. 2. Inhibition of mucinolytic activity of the Tsh protein by anti-Tsh antibody. Lanes A: purified r-TSH protein; B: purified r-TSH protein incubated with 5 μ l of anti-Tsh; C: purified r-TSH protein incubated with 10 μ l of anti-Tsh. The positions of molecular mass markers are indicated at the left.