

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Caracterização do Exoproteoma Basal e Variante
de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a
Relação com a Virulência Reduzida de uma
Linhagem Mutante para um Fator Sigma
Alternativo**

Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Vasco A. C. Azevedo

Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Caracterização do Exoproteoma Basal e Variante de
Corynebacterium pseudotuberculosis e a Relação com a
Virulência Reduzida de uma Linhagem Mutante para um
Fator Sigma Alternativo.**

Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira

Belo Horizonte

2010

Esta tese é dedicada aos meus pais, Marilane e Hilton, e aos meus irmãos, Pablo e Carol, que me apoiaram desde o nascimento deste sonho. Também dedico este trabalho à Natália e aos meus grandes amigos, que vivem este sonho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pela excelente formação profissional que me foi oferecida durante todos esses anos, e pela enorme contribuição para minha formação pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela indispensável contribuição para o custeio de todos os meus anos na Pós-Graduação.

Ao Prof. Vasco Azevedo, por todo o investimento depositado em mim durante tantos anos e por me abrir um mundo de conhecimento e de oportunidades.

Ao Prof. Sérgio Costa, por assumir junto com o Prof. Vasco a tarefa de orientação deste trabalho de doutorado, e por contribuir de forma essencial para a minha formação.

Ao Prof. Christopher Dowson e ao Prof. Martin Feelisch, ambos da University of Warwick, pelo envolvimento voluntário e tão decisivo para o bom desenvolvimento desta tese.

Ao Thiago Castro, pela inestimável ajuda em todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Núbia Seyffert, Susan Slade, Natália Carvalho, Fernanda Dorella, Simone Santos, Héliida Andrade, Agenor Valadares, Pablo Mathias, Anderson Santos e Anderson Miyoshi, pelo excepcional apoio nas diversas partes deste trabalho.

A todos os colaboradores de dentro e fora do ICB, sem os quais esta tese não seria possível.

Aos companheiros do Laboratório de Genética Celular e Molecular, por todo o esforço e doação que fazem deste grupo um diferencial.

Finalmente, agradeço aos meus familiares, amigos e todas as pessoas próximas que, mesmo indiretamente, também contribuíram decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.

“Depois de escalar uma montanha muito alta, descobrimos que há muitas outras montanhas por escalar.”

Nelson Mandela

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado a tudo que sabemos e entendemos, enquanto a imaginação envolve o mundo inteiro e tudo que há para conhecer e entender.”

Albert Einstein

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, causadora da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes. Como um patógeno intracelular facultativo, *C. pseudotuberculosis* precisa sobreviver às condições adversas encontradas no organismo hospedeiro a fim de causar uma infecção de sucesso. Então, é necessário que esta bactéria responda de forma eficiente às alterações do ambiente extracelular. Um dos mecanismos sofisticados utilizados por bactérias patogênicas para alcançar tal objetivo é a ativação transiente de genes específicos de resposta ao estresse por fatores sigma (σ) alternativos da RNA polimerase. Neste estudo, foi avaliada a contribuição de um fator σ de resposta ao estresse extracitoplasmático (sigE) para a regulação do proteoma extracelular de *C. pseudotuberculosis* e para a virulência desta bactéria. O foco no estudo das proteínas exportadas se deve ao fato de estas compreenderem grande parte dos fatores moleculares utilizados por patógenos para interação com o hospedeiro. Primeiramente, foi implementado um protocolo para análise total do exoproteoma de linhagens tipo-selvagem (wt) de *C. pseudotuberculosis* apresentando diferentes perfis de virulência. A estratégia proteômica utilizada permitiu a caracterização do exoproteoma basal desta bactéria, além da identificação de exoproteínas variantes que provavelmente contribuem para o fenótipo de virulência. Em seguida, o método foi utilizado para investigar as alterações ocorridas no exoproteoma de uma linhagem mutante para o fator σ alternativo sigE, sob condições normais de crescimento ou após tratamento com o agente gerador de estresse nitrosativo óxido nítrico (NO). Isto porque esta linhagem foi mais sensível que a linhagem tipo-selvagem ao estresse nitrosativo *in vitro*. Além disso, a linhagem mutante Δ sigE de *C. pseudotuberculosis* mostrou-se muito mais virulenta após infecção de camundongos deficientes para a enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS^{-/-}) do que de animais C57BL/6, indicando a importância deste fator também para a resistência ao estresse nitrosativo *in vivo*. Foi possível confirmar que o exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* se altera em resposta ao estresse causado por NO. Enquanto as alterações observadas na linhagem wt foram pequenas e indicativas de uma resposta específica ao estresse nitrosativo, o exoproteoma da linhagem mutante variou significativamente, e o conjunto de proteínas variantes é indicativo de uma resposta compensatória ao NO, aparentemente desencadeada pela falta do fator sigE.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats. This Gram-positive bacterium can successfully infect and reside in phagocytic cells, and for doing so it needs to be able to resist to a plenty of adverse conditions found in the intracellular environment. Bacteria can respond to extracytoplasmic stress through switching of the sigma (σ) factor associated with the core RNA polymerase by alternative σ factors, which give new promoter specificities to the polymerase and then transiently activate the transcription of stress responsive genes. Herein, we have evaluated the contribution of an extracytoplasmic function sigma factor (sigE) to the regulation of the extracellular proteome of *C. pseudotuberculosis* in response to stress and to the virulence of this bacterium. A novel protocol was implemented in this study for characterizing the exoproteome of two wild-type strains of *C. pseudotuberculosis* that present different virulence phenotypes. The proteomic strategy allowed for identification of the core exoproteome of this bacterium, besides permitting us to identify variant exoproteins probably associated with the diverse infective potential of the strains. When used to analyze the exoproteome of a mutant strain of *C. pseudotuberculosis*, deficient in the alternative sigma factor sigE, this proteomic method helped us to identify proteins differentially regulated in this strain, compared to the wild-type, both in normal growth conditions and under nitrosative stress caused by nitric oxide (NO). The $\Delta sigE$ mutant strain was seen to be much more sensitive to this type of stress *in vitro*, and apparently NO produced by phagocytic cells is a key component contributing for the reduced ability of this strain to survive in the host. We could speculate on a role for the sigE regulated exoproteins in the resistance of *C. pseudotuberculosis* to nitrosative stress during infection.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>.....	27
2.1 Artigo de Revisão	28
Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> : microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. <i>Veterinary Research</i> , v.37, p.201 - 218, 2006.....	28
2.2 Artigo de Revisão	47
Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R. W., Meyer, R., Miyoshi, A, Azevedo, V. Antigenes of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> and prospects for vaccine development. <i>Expert Review of Vaccines</i> , v.8, p.205 - 213, 2009.	47
2.3 Capítulo de livro	57
Moore, R.; Miyoshi, A.; Pacheco, L.G.C.; Seyffert, N.; Azevedo, V. <i>Corynebacterium</i> and <i>Arcanobacterium</i> . In. <i>Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th Edition</i> . Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., Thoen, C.O. (Ed.). Wiley-Blackwell, USA:2010. 704 p. (no prelo). ISBN: 978-0-8138-1237-3	57
3. OBJETIVOS.....	58
3. OBJETIVOS.....	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	61
4.2 Identificação e caracterização dos fatores σECF.....	61
4.3 Geração de linhagens mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i>.....	63
4.4 Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante 1002(ΔsigE) de <i>C. pseudotuberculosis</i>.....	63
4.5 Condições de estresse in vitro	64

4.6 Implementação de um sistema para avaliação da liberação de NO in vitro	64
4.7 Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> a condições de estresse in vitro	66
4.8 Infecção de células RAW264.7 em cultura com as linhagens tipo-selvagem e mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i>	67
4.9 Avaliação da liberação de NO intracelular por microscopia confocal	68
4.10 Extração de proteínas extracelulares pelo método TPP	68
4.11 Eletroforese bidimensional (2-D) de proteínas exportadas	69
4.12 Análise de spots protéicos, digestão das proteínas no gel e espectrometria de massa por MALDI-TOF MS/MS.....	69
4.13 Análises proteômicas qualitativas e quantitativas das proteínas exportadas, utilizando o método LC-MS ^E	70
4.14 Animais experimentais.....	70
4.15 Extração e cultivo de células da medula óssea e diferenciação em macrófagos	71
4.16 Infecção dos macrófagos derivados da medula óssea (BMMØs) e determinação do crescimento intracelular da <i>C. pseudotuberculosis</i>	71
4.17 Ensaio de viabilidade dos BMMØs após infecção	72
4.18 Infecção experimental dos camundongos e análises de persistência	72
4.19 Papel dos fatores sigma ECF na resistência ao estresse nitrosativo in vivo	73
4.20 Construção de plasmídeos para tentativa de complementação da mutação do fator sigE	73
4.21 Análises bioinformáticas e estatísticas	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE I.....	74
IMPLEMENTAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA PROTEÔMICA PARA ANÁLISE COMPARATIVA DE EXOPROTEOMAS BACTERIANOS.....	74
5.1 Introdução.....	75
5.2 Artigo:	76
Three-Phase Partitioning Combined with LC-MS ^E for Comparative Analysis of the <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> Exoproteome. (Submetido para publicação no periódico <i>Molecular and Cellular Proteomics</i> - Online ISSN: 1535-9484)	76
Abstract	78
Introduction	79
Experimental Procedures.....	81
Bacterial strains and culture conditions	81

Three-phase partitioning.....	82
In-solution tryptic digestion of TPP-extracted proteins	82
LC-MS configurations for label-free analysis (LC-MS ^E)	83
Data processing for label-free acquisitions (MS ^E).....	84
Database searches.....	84
Protein quantification using label-free system (MS ^E).....	85
<i>In silico</i> predictions of protein sub-cellular localization	85
Comparative analyses of multiple corynebacterial exoproteomes.....	85
Results and Discussion.....	86
Exoproteome analysis of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	86
Prediction of sub-cellular localization of the identified proteins.....	88
Non-classically secreted proteins	90
The variant exoproteome may account for differential virulence of the two <i>C. pseudotuberculosis</i> strains	92
Variation of the core exoproteome: differential expression analysis of the common proteins by LC-MS ^E	94
Comparative analyses of corynebacterial exoproteomes	95
Conclusions	97
References	99

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE II 120

PAPEL DO FATOR SIGMA ALTERNATIVO SIGE NA REGULAÇÃO DA EXPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS EM RESPOSTA AO ESTRESSE E NA VIRULÊNCIA DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* 120

6.1 Introdução..... 121

6.2 Identificação de fatores sigma ECF e construção de linhagens mutantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*..... 122

6.2.1 Isolamento, clonagem e caracterização de fatores sigma ECF..... 122

6.2.2 Geração da linhagem mutante 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*..... 127

6.3 Análises fenotípicas das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 129

6.3.1 Curvas de crescimento das linhagens em meio rico (BHI) e em meio quimicamente definido (MQD)..... 129

6.3.2 Determinação das condições de estresse *in vitro* a serem testadas

6.3.3 Resistência das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) a agentes geradores de estresse *in vitro*..... 135

6.4 Avaliação do estresse nitrosativo sofrido pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* no ambiente intracelular 139

6.5 Análises proteômicas comparativas dos exoproteomas das linhagens 1002wt e mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*, tratadas ou não com NO 141

6.5.1 Alterações qualitativas dos proteomas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ em resposta ao NO

6.5.2 Alterações quantitativas dos proteomas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ em resposta ao NO..... 143

6.6 Avaliação do papel do fator sigE na virulência da bactéria *C. pseudotuberculosis*..... 145

6.6.1 Infecção de animais tipo-selvagem C57BL/6 e nocaute iNOS^{-/-} com as linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*..... 145

6.7 Tentativa de complementação da mutação do gene sigE na linhagem mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i>.....	147
6.7.1 Análise de expressão da proteína sigE nas linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> transformadas com o plasmídeo pLP5	148
6.8 Modelo esquemático baseado nos resultados deste estudo com o fator sigma ECF sigE de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	150
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	151
7.1 Conclusões.....	152
7.2. Perspectivas.....	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
9. ANEXOS	165
9.1 Anexo I – Resultados complementares	166
9.2 Anexo II – Publicações durante o período de doutoramento	174
9.3 Anexo III – Currículo Lattes	193

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 Introdução Geral

Tabela 1.1 Fatores sigma alternativos envolvidos em virulência. (p.21)

Capítulo 4 Materiais e Métodos

Tabela 4.1 Meio quimicamente definido para cultivo de *C. pseudotuberculosis*. (p.61)

Tabela 4.2 Iniciadores utilizados para amplificação dos fatores σ ECF. (p.62)

Tabela 4.3 Iniciadores utilizados para confirmação da mutação na linhagem 1002($\Delta sigE$). (p.64)

Tabela 4.4 Condições de estresse *in vitro*. (p.65)

Capítulo 5 Resultados e Discussão: Parte I

Tabela 5.1 Proteins composing the core *C. pseudotuberculosis* exoproteome, identified by LC-MS^E (p.107)

Tabela 5.2 Variant exoproteome of the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis* (p.110)

Tabela 5.3 Variant exoproteome of the strain C231 of *C. pseudotuberculosis* (p.112)

Tabela 5.4 Formerly and newly identified exported proteins that may be associated with the virulence phenotype of *C. pseudotuberculosis* strains. (p.114)

Capítulo 6 Resultados e Discussão: Parte II

Tabela 6.1 Agrupamento das seqüências de fatores sigma ECF utilizadas neste trabalho. (p.122)

Tabela 6.2 Resultados de alguns dos seqüenciamentos dos fragmentos de PCR obtidos com iniciadores degenerados para os fatores *sigH* e *sigD*. (p.126)

Tabela 6.3 Resistência da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse. (p.132)

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 Introdução Geral

- Figura 1.1 Diferentes condições de estresse encontradas por bactérias patogênicas no ambiente intrafagossômico. (p.19)
- Figura 1.2 Representação esquemática da regulação de genes bacterianos por fatores sigma alternativos. (p.20)
- Figura 1.3 Árvore filogenética de fatores sigma ECF. (p.22)
- Figura 1.4 Estrutura molecular característica de fatores sigma ECF. (p.23)

Capítulo 4 Materiais e Métodos

- Figura 4.1 Sistema para quantificação da liberação de óxido nítrico (NO) em cultura. (p.66)

Capítulo 5 Resultados e Discussão: Parte I

- Figura 5.1 Analysis of the extracellular proteins of two different *C. pseudotuberculosis* strains allowed for identification of the core and variant exoproteomes. (p.106)
- Figura 5.2 Most of the identified *C. pseudotuberculosis* exoproteins were predicted by the SurfG+ program as having an extracytoplasmic localization. (p.106)
- Figura 5.3 Differential expression of the proteins composing the core *C. pseudotuberculosis* exoproteome, evaluated by label-free relative quantification using LC-MS^E. (p.106)
- Figura 5.4 Comparative analysis of corynebacterial exoproteomes. (p.106)

Capítulo 6 Resultados e Discussão: Parte II

- Figura 6.1 Regiões conservadas entre os fatores sigE utilizados para desenho de iniciadores degenerados. (p.123)
- Figura 6.2 Reações de PCR utilizando iniciadores degenerados e não-degenerados para amplificação dos fatores sigma ECF. (p.124)
- Figura 6.3 Identificação do fator sigma ECF *sigE* no genoma da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (p.125)
- Figura 6.4 Resultado das buscas *in silico* de fatores sigma ECF no Genoma completamente anotado da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. (p.126)
- Figura 6.5 Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante 1002(Δ *sigE*). (p.128)
- Figura 6.6 Curvas de crescimento das linhagens tipo-selvagem (1002wt) e mutante (Δ *sigE*) de *C. pseudotuberculosis*, em meio BHI e MQD. (p.131)
- Figura 6.7 Análises morfológicas das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*. (p.131)
- Figura 6.8 Avaliação da liberação de NO em cultura pelo agente doador DETA/NO. (p.134)
- Figura 6.9 Resistência das linhagens 1002wt e 1002(Δ *sigE*) de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse *in vitro*. (p.136)

- Figura 6.10 Análises de viabilidade das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis* após exposição a agente gerador de estresse nitrosativo (DETA/NO). (p.138)
- Figura 6.11 Avaliação do estresse nitrosativo sofrido pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* no ambiente intracelular. (p.140)
- Figura 6.12 Desempenho da estratégia proteômica utilizada para análise comparativa dos exoproteomas das linhagens de *C. pseudotuberculosis*, tratadas ou não com NO. (p.141)
- Figura 6.13 Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* identificadas nos 4 grupos experimentais. (p.143)
- Figura 6.14 Expressão diferencial das proteínas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao NO. (p.144)
- Figura 6.15 Infecção de camundongos C57BL/6 e iNOS^{-/-}, e de macrófagos em cultura com as linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*. (p.146)
- Figura 6.16 Análise de regiões promotoras do gene *sigE* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (p.148)
- Figura 6.17 Plasmídeos para complementação (pLP3) e super-expressão (pLP5) do fator *sigE*. (p.149)
- Figura 6.18 Análise de expressão do fator *sigE* a partir do plasmídeo pLP5. (p.149)
- Figura 6.19 Representação esquemática da participação do fator *sigE* de *C. pseudotuberculosis* na resistência ao estresse nitrosativo intracelular. (p.150)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Instituições

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
RGMG	Rede Genoma de Minas Gerais
RPGP	Rede Paraense de Genômica e Proteômica
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

Termos técnicos

μ l – microlitro; μ m – micrômetro; 2D-PAGE – eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida; AUC – área sob a curva; BHI – infusão cérebro coração; BMMØs – macrófagos derivados de medula óssea; DAF-2 – 4,5-Diaminofluoresceína diacetato; DETA/NO – Diethylenetriaamine NONOate; DiSC₃ - 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide; DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco; DO – densidade ótica; ECF – função extra-citoplasmática; eV – eletrovolt; IEF – focalização isoeletrica; iNOS – óxido nítrico sintase indutível; IPTG – isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo; kan – canamicina; kDa – kilodalton; LC – cromatografia líquida; LC – linfadenite caseosa; MALDI-TOF MS/MS – matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; MQD – meio quimicamente definido; MS – espectrometria de massa; nm – nanômetro; NO – óxido nítrico; pA – picoampere; PBS – tampão salino fosfato; PCR – reação em cadeia da polimerase; PLD – fosfolipase D; RNS – espécies reativas de nitrogênio; ROS – espécies reativas de oxigênio; rpm – rotações por minuto; SFB – Soro fetal bovino; TPP – método de fracionamento em três fases; UFC – unidades formadoras de colônias; V – volts.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, causadora da linfadenite caseosa (LC) – mal do carço – em pequenos ruminantes (Dorella et al., 2006a). Essa doença crônica contagiosa apresenta-se em duas formas principais, que podem se desenvolver concomitantemente: uma forma externa, caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais de ovinos e caprinos; e uma forma interna, em que os abscessos aparecem nos linfonodos viscerais ou em órgãos como pulmão, fígado, rins, útero e baço (Kuria et al., 2001; Williamson, 2001; Baird & Fontaine, 2007).

A LC é distribuída mundialmente e é altamente prevalente em países onde a ovinocaprinocultura é intensa, tais como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Brasil (Williamson, 2001; Arsenault et al., 2003; Paton et al., 2003; Dorella et al., 2006a). No Brasil, os Estados da Região Nordeste são os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos ovinos e caprinos do país (Alves & Pinheiro, 1997; Ribeiro et al., 2001). Minas Gerais, apesar de ainda possuir um rebanho reduzido, tem apresentado crescimento na atividade de ovinocultura e a LC já tem sido observada com alta frequência (aproximadamente 80% dos animais avaliados) principalmente nos criatórios da região Norte do Estado (Faria et al., 2004; Seyffert et al., 2010).

As perdas econômicas acarretadas pela LC são evidenciadas em maior parte através da diminuição na produção de leite, carne e lã, da desvalorização da pele devido às cicatrizes e do custo das drogas e da mão-de-obra para tratar os abscessos superficiais dos animais (Alves & Pinheiro, 1997). Perdas ainda mais importantes podem acontecer no abate, quando parte ou até mesmo carcaças inteiras podem ser condenadas (Arsenault et al., 2003; Baird & Fontaine, 2007).

Devido à grande importância para a agropecuária mundial, muito já se estudou sobre a patogênese da LC (Baird & Fontaine, 2007; McKean et al., 2007a). Após a entrada no hospedeiro, que acontece geralmente através de feridas na pele, a *C. pseudotuberculosis* se espalha rapidamente para o linfonodo drenante local. Este processo depende da habilidade da bactéria de resistir à fagocitose e de existir como um parasita intracelular facultativo. Através de repetidos ciclos de (1) replicação, (2) lise das células

fagocíticas e (3) re-infecção de novos fagócitos, as bactérias conseguem colonizar os linfonodos e sobreviver. No linfonodo, múltiplos piogranulomas microscópicos se desenvolvem, aumentam em tamanho e se fundem para formar abscessos maiores. Algumas vezes ocorre disseminação da infecção pelo sangue ou pelo sistema linfático, levando a lesões similares em outros órgãos. As lesões da LC se desenvolvem vagarosamente, resultando em uma doença crônica que perdura muitas vezes por toda a vida do animal. Bactérias viáveis podem ser recuperadas de abscessos até vários anos depois da infecção inicial. Pode também ocorrer reativação da doença, com o desenvolvimento de lesões em novos sítios depois de um período considerável de cura aparente (Pepin et al., 1994; Baird & Fontaine, 2007; McKean et al., 2007a).

Apesar de o processo patogênico da doença ser relativamente bem entendido, muito pouco foi estudado sobre os determinantes moleculares de virulência da *C. pseudotuberculosis*, bem como sobre o controle da sua expressão gênica (McKean et al., 2005 e 2007a; Dorella et al., 2006b).

Apenas dois genes associados à virulência da *C. pseudotuberculosis* já foram estudados com mais detalhes, e suas funções são consideradas essenciais para o estabelecimento da LC: *fagB* e *pld*. O primeiro codifica um dos componentes de um sistema de permease de ferro (Billington et al., 2002), enquanto o outro codifica uma fosfolipase D secretada com atividade de esfingomielinase (Carne, 1940; Songer, 1997). Experimentos com linhagens mutantes de *pld* indicam que esta toxina auxilia na disseminação das bactérias do sítio inicial da infecção para os linfonodos. Além disso, estes mutantes causam danos mínimos no hospedeiro, demonstrando o papel central que a proteína PLD tem no processo patogênico da *C. pseudotuberculosis* (Hodgson et al., 1992; McNamara et al., 1994). Estudos recentes avaliaram o controle da expressão do gene *pld* sob diferentes condições e concluíram que este fator de virulência tem sua expressão reduzida quando a *C. pseudotuberculosis* é exposta ao choque térmico (43°C), ao passo que sua expressão é muito aumentada quando as bactérias infectam macrófagos (McKean et al. 2007a; 2007b). De forma similar ao *pld*, o mutante para o gene *fagB* tem habilidade reduzida de sobreviver e de causar abscessos em caprinos infectados experimentalmente, devido à incapacidade da linhagem mutante de obter ferro dentro do organismo hospedeiro (Billington et al., 2002).

Trabalhos recentes vêm tentando identificar novos determinantes moleculares que contribuem para a virulência da *C. pseudotuberculosis*. McKean e colaboradores (2005) utilizaram a técnica de “Indução Diferencial de Fluorescência” (DFI) para identificar genes que são diferencialmente expressos nessa bactéria durante a infecção de macrófagos; dentre os fatores mais expressos destacaram-se uma sintetase peptídica não-ribossômica e uma subunidade da enzima propionil-CoA-carboxilase (McKean et al., 2005). Utilizando uma estratégia diferente, baseada na transposição do elemento TnFuZ, o nosso grupo de trabalho no Laboratório de Genética Celular Molecular identificou genes de *C. pseudotuberculosis* que codificam proteínas exportadas, como subunidades fimbriais e adesinas, as quais estão provavelmente envolvidas diretamente com os processos de entrada e sobrevivência da bactéria nas células hospedeiras (Dorella et al., 2006b). As linhagens mutantes para esses fatores exportados estão sendo avaliadas atualmente em relação à virulência e à capacidade de induzir resposta imunológica protetora em animais previamente imunizados (Dorella, 2009).

Atualmente, a pesquisa por determinantes moleculares de virulência em diversos agentes patogênicos tem dedicado atenção às proteínas reguladoras da expressão gênica (Kazmierczak et al., 2005). Isto porque patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis*, precisam se adaptar a diferentes condições ambientais durante seu curso de infecção, além de ter que resistir à resposta adaptativa do hospedeiro. Dessa forma, a resposta ao estresse ambiental representa um importante fator que contribui para a virulência (Bashyam & Hasnain, 2004; Rohde et al., 2007; Schaible, 2009).

Especificamente, a *C. pseudotuberculosis* pode sobreviver às condições adversas do meio ambiente por até 8 meses antes de infectar um organismo hospedeiro (Baird & Fontaine, 2007). Durante o processo infeccioso a bactéria também é exposta a uma gama de diferentes ambientes, começando no ponto de entrada no hospedeiro, passando pelo tráfico através do sistema linfático, até o estabelecimento das lesões dentro dos órgãos. Os nichos nos quais ela deve sobreviver variam do ambiente aeróbico do ponto inicial de infecção até a replicação intracelular em macrófagos (McKean et al., 2007a; 2007b). Um fato interessante é que, diferente de outros patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella abortus*, a *C. pseudotuberculosis* aparentemente não impede a fusão do fagossomo com o lisossomo dentro dos macrófagos (Tashjian and Campbell, 1983). De

maneira contrária, ela sobrevive à fusão “fagolisossomo” e ainda mata as células fagocíticas infectadas dentro de poucas horas (Tashjian and Campbell, 1983; McKean et al., 2007b). Isso implica que a bactéria é capaz de resistir a um ambiente extremamente hostil, com baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo (Fig. 1.1) (Rohde et al., 2007; Schaible, 2009). Certamente, mudanças na expressão gênica têm um papel definitivo nas adaptações e modificações necessárias para uma infecção de sucesso.

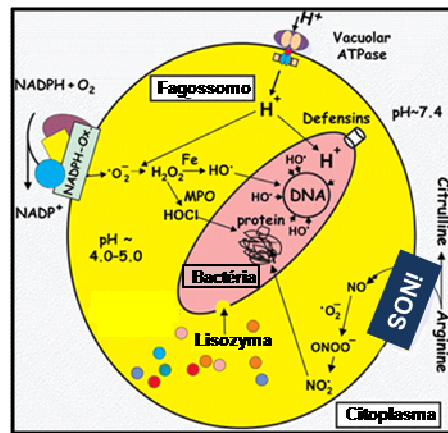


Figura 1.1 Diferentes condições de estresse encontradas por bactérias patogênicas no ambiente intrafagossômico. Acessível em: <http://www.uni-koeln.de/> TRADUZIDO E ADAPTADO.

Os fatores sigma (σ) alternativos da RNA polimerase bacteriana proporcionam um meio de regular rapidamente a expressão gênica em resposta a várias mudanças do ambiente extracelular (Helmann, 2002; Staroń et al., 2009). Estes fatores compreendem uma classe de proteínas que constituem subunidades dissociáveis essenciais da RNA polimerase dos procariotos. A associação de fatores σ alternativos com as subunidades principais da RNA polimerase proporciona um mecanismo de respostas celulares mediado pelo redirecionamento do início da transcrição, fornecendo especificidade de reconhecimento de promotores para a polimerase (Fig. 1.2) (Krebs et al., 2010).

Uma vez que o “reguloma” de um único fator σ pode ser compreendido por centenas de genes, estes fatores proporcionam mecanismos efetivos para a regulação simultânea da expressão de vários genes bacterianos. Em alguns casos, os genes que compreendem o “reguloma” de um fator σ possuem uma função primária claramente definida (por exemplo, genes regulados pelos fatores σ de esporulação em *Bacillus subtilis*); em outros, os genes que compreendem um “reguloma” podem contribuir para funções múltiplas da fisiologia do organismo (por exemplo, a regulação dos genes de

resposta geral ao estresse e dos genes expressos na fase estacionária pelo fator σ^B da *Listeria monocytogenes* (Fig. 1.2) (Helmann, 2002; Kazmierczak et al., 2005).

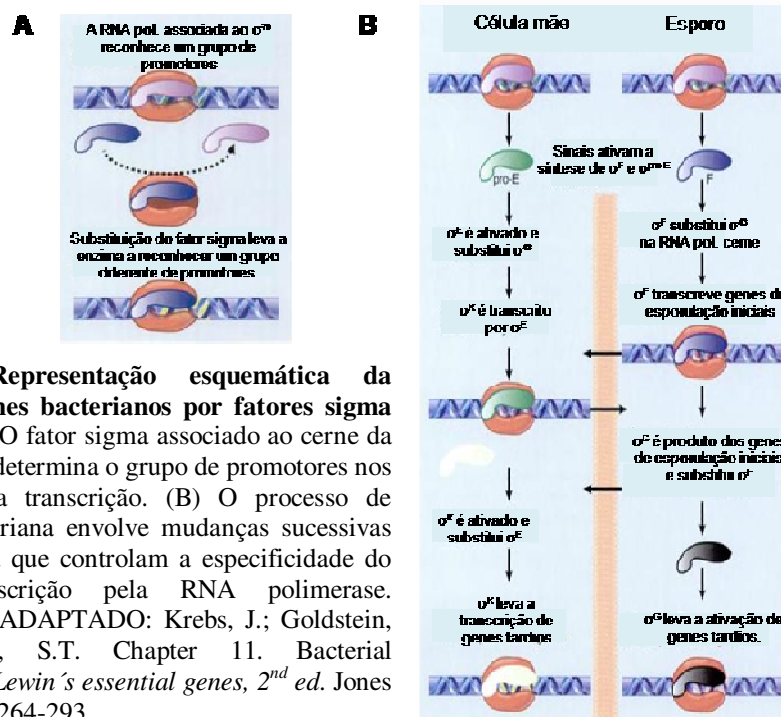


Figura 1.2. Representação esquemática da regulação de genes bacterianos por fatores sigma alternativos. (A) O fator sigma associado ao cerne da RNA polimerase determina o grupo de promotores nos quais se inicia a transcrição. (B) O processo de esporulação bacteriana envolve mudanças sucessivas nos fatores sigma que controlam a especificidade do início da transcrição pela RNA polimerase. TRADUZIDO E ADAPTADO: Krebs, J.; Goldstein, E.S.; Kilpatrick, S.T. Chapter 11. Bacterial Transcription. In *Levin's essential genes, 2nd ed.* Jones and Barlett:2010. 264-293.

Um campo emergente de pesquisa é a identificação dos papéis específicos de fatores σ alternativos na regulação da expressão de genes de virulência e de genes associados com virulência em patógenos bacterianos. Especificamente, genes de virulência codificam proteínas cujas funções são essenciais para a bactéria estabelecer efetivamente uma infecção no organismo hospedeiro. Por outro lado, genes associados à virulência podem contribuir para a sobrevivência da bactéria no meio ambiente ou para a sobrevivência dentro do hospedeiro. Portanto, a ativação de genes associados à virulência pode aumentar a capacidade de uma bactéria de se disseminar para novos indivíduos ou de sobreviver às defesas do organismo infectado. Considerando que fatores σ alternativos regulam a expressão de ambos, genes de virulência ou associados à virulência, estes fatores podem contribuir diretamente e indiretamente para a patogenicidade bacteriana (Bashyam & Hasnain, 2004; Kazmierczak et al., 2005; Chaturongakul et al., 2008).

A regulação da expressão de genes de virulência por fatores σ alternativos frequentemente ocorre em resposta a estímulos ambientais particulares (Chaturongakul et

al., 2008; Mehra & Kaushal, 2009). O exemplo mais importante é o do gene que codifica o fator homólogo de σ^E da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (gene *algUalgT*). Isolados patogênicos de *P. aeruginosa* produzem um exo-polissacarídeo abundante conhecido como alginato, que é considerado um dos principais fatores de virulência dessa bactéria. O fator algU, além de controlar a expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo, também regula as enzimas da via de biossíntese do alginato (Potvin et al., 2008; Wood & Ohman, 2009). Similarmente, os fatores σ^E de *Salmonella enterica* var. Typhimurium e *Mycobacterium tuberculosis* também regulam genes que proporcionam resistência ao estresse oxidativo, auxiliando na sobrevivência das bactérias dentro de macrófagos (Testerman et al., 2002; Manganelli et al., 2004; Kazmierczak et al., 2005). A tabela 1.1 mostra alguns exemplos de fatores σ envolvidos com a virulência de diferentes agentes patogênicos.

Tabela 1.1 – Fatores sigma alternativos envolvidos em virulência.

Fator sigma (classe / sub-família)	Espécie bacteriana
Família σ^{70}	
Resposta geral ao estresse	
σ^B	<i>B. anthracis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Epidermidis</i>
σ^S	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>S. enterica</i> var. Typhi
σ^F	<i>M. tuberculosis</i>
Sub-família ECF	
RpoE	<i>H. influenzae</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>V. cholerae</i>
AlgU	<i>P. aeruginosa</i>
PvdS, Fpvl	<i>P. aeruginosa</i>
σ^C	<i>M. tuberculosis</i>
σ^D	<i>M. tuberculosis</i>
σ^E	<i>M. tuberculosis</i>
σ^H	<i>M. tuberculosis</i>
HrpL	<i>Erwinia spp.</i> , <i>P. syringae</i>
σ^{28} FliA	<i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>V. cholerae</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
Família σ^{54}	
σ^N	<i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. syringae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>

TRADUZIDO E ADAPTADO: Kazmierczak et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(4), 2005.

Dentre os fatores σ alternativos, as proteínas da sub-família ECF (do inglês, *extracytoplasmic function*) têm um papel destacado na regulação de processos relacionados ao envelope celular bacteriano, incluindo secreção, síntese de exopolissacarídeos, influxo/ efluxo de ferro, e síntese de proteases extracelulares. Tais processos compõem parte do repertório de invasão do hospedeiro e de fuga do sistema imunológico utilizado por bactérias patogênicas durante a infecção (Helmann, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004; Jordan et al., 2008).

Os membros da sub-família ECF de fatores σ^{70} são conservados em bactérias Gram-negativas e em Gram-positivas (Fig.1.3). A designação “função extra-citoplasmática” (ECF) evoluiu de uma análise dos exemplos de funções conhecidas dos fatores σ do grupo 4. Este grupo inclui reguladores do estresse periplasmático e da resposta de choque térmico (σ^E em *E. coli*), do transporte de ferro (FecI em *E.coli*), de um sistema de efluxo de íons (CnrH em *Alcaligenes*), da secreção de alginato (AlgU/T em *P. aeruginosa*) e da síntese de carotenóides localizados na membrana em *Myxococcus xanthus* (CarQ). A única característica unificadora desses processos biológicos diversos é que todos eles envolvem processos do envelope celular (transporte, secreção, estresse extra-citoplasmático) (Helmann, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004; Staroń et al., 2009).

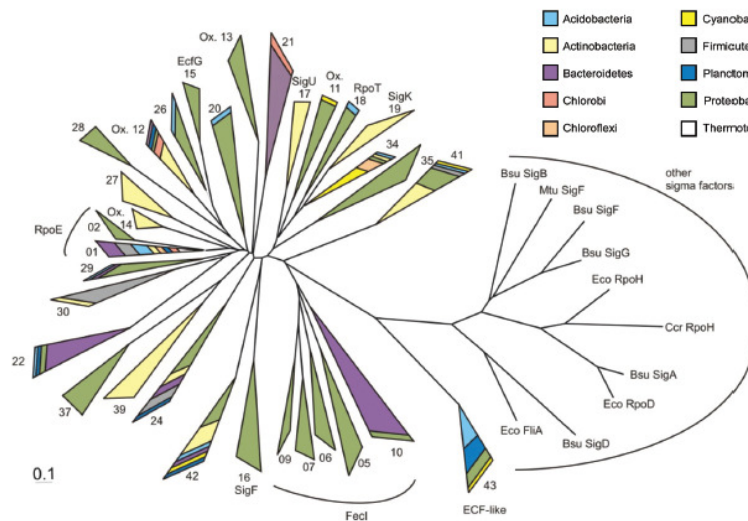


Figura 1.3. Árvore filogenética de fatores sigma ECF. Cada triângulo representa um grupo principal de bactérias, codificado por cores de acordo com a distribuição dos fatores σ ECF. O comprimento das extremidades dos triângulos reflete a diversidade de sequência dos fatores σ ECF dentro de cada grupo. Bsu (*B. subtilis*), Ccr (*C. crescentus*), Eco (*E.coli*), Mtu (*M. tuberculosis*). TRADUZIDO: Staroń et al. *Mol Microbiol.* 74(3), 2009.

Como componentes de uma classe específica, os fatores σ ECF compartilham várias características moleculares comuns: (1) são proteínas pequenas que carregam somente dois dos quatro domínios conservados geralmente presentes em fatores σ primários (Fig.1.4); (2) eles frequentemente reconhecem elementos promotores com um motivo “AAC” na região -35; (3) em muitos casos estes fatores são co-transcritos com um fator anti-sigma transmembrânico que possui um domínio sensorial extra-citoplasmático e um domínio inibitório intracelular; e (4) eles frequentemente controlam funções associadas com alguns aspectos da superfície celular ou de transporte (Helmann, 2002; Starón et al., 2009).

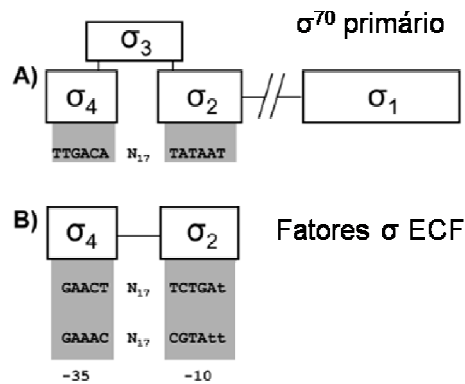


Figura 1.4. Estrutura molecular característica de fatores sigma ECF. Arquitetura de domínios e de promotores alvos de (A) fatores σ primários e (B) fatores σ ECF. As regiões conservadas σ^1 , σ^2 , σ^3 e σ^4 são mostradas. TRADUZIDO E ADAPTADO: Starón et al. *Mol Microbiol.* 74(3), 2009.

Análises comparativas recentes das seqüências genômicas bacterianas disponíveis em bancos de dados revelaram uma ampla variação no número de genes de fatores σ ECF entre diversos microrganismos: 0 em *Mycoplasma*, 2 em *E.coli*, 7 em *B. subtilis*, 10 em *M. tuberculosis*, 50 em *Streptomyces coelicolor*, chegando ao máximo de 83 em *Sorangium cellulosum*. Dentre as espécies do gênero *Corynebacterium* que possuem Genoma completamente seqüenciado, as patogênicas *C. diphtheriae* e *C. jeikeium* apresentam 7 genes de prováveis fatores σ ECF, ao passo que as ambientais *C. glutamicum* e *C. efficiens* apresentam somente 5 (Jordan et al., 2008; Starón et al., 2009).

Num dos trabalhos pioneiros envolvendo os fatores σ da sub-família ECF, Manganelli e colaboradores (1999) desenvolveram um sistema de PCR em tempo real que utilizava várias sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente a expressão

diferencial dos 10 fatores σ ECF presentes no genoma da bactéria *M. tuberculosis*, sob diversas condições ambientais. Três dos fatores analisados, incluindo o fator σ^E , tiveram níveis de transcrição aumentados após choque térmico e também responderam ao estresse de superfície celular induzido por tratamento com SDS (Manganelli et al., 1999).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que um mutante de *M. tuberculosis* deficiente no fator σ^E era muito mais susceptível à atividade microbicida de macrófagos em cultura e era altamente atenuado em camundongos infectados experimentalmente, demonstrando a importância deste fator para a virulência dessa bactéria (Manganelli et al., 2001; Manganelli et al., 2004).

Utilizando estratégias experimentais similares, outros trabalhos também sugeriram papéis para os fatores σ ECF σ^H e σ^D na regulação de genes associados à virulência em *M. tuberculosis* (Kaushal et al., 2002; Calamita et al., 2005; Mehra & Kaushal, 2009). Além disso, dois estudos muito interessantes demonstraram que variações na imunogenicidade de linhagens do *M. bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG) são devidas a mutações do fator sigma ECF σ^K ou do fator anti-sigK (Charlet et al., 2005; Saïd-Salim et al., 2006).

Só recentemente estudos avaliaram a participação de fatores σ ECF na regulação da expressão gênica em uma espécie do gênero *Corynebacterium*, a bactéria ambiental *C. glutamicum*. Kim e colaboradores (2005) demonstraram que o fator σ^H é importante para a resistência ao estresse oxidativo e ao choque térmico. A inativação do fator σ^M tornou a bactéria mais sensível ao calor, ao frio e às condições de oxidação dos grupos tiol (-SH) nas proteínas (Nakunst et al., 2007). Finalmente, uma linhagem de *C. glutamicum* deficiente para o fator σ^E tornou-se mais vulnerável a condições de estresse de superfície, como tratamento com SDS ou lisozima, além de muito mais sensível a diferentes antibióticos (Park et al., 2008).

A hipótese do presente trabalho é que fatores sigma ECF também participam da resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a condições de estresse do ambiente externo, provavelmente através da regulação de proteínas exportadas, e contribuem para a virulência desta bactéria.

Para estudar esta questão, foi utilizada uma estratégia experimental combinando metodologias de análises microbiológicas, moleculares, proteômicas e bioinformáticas,

além de metodologias para estudo de virulência de linhagens mutantes para fatores σ específicos.

Especificamente, o foco das análises proteômicas foi o conjunto de proteínas exportadas pela *C. pseudotuberculosis* (exoproteoma), uma vez que se acredita que os fatores σ da sub-família ECF podem controlar processos relacionados à exportação de proteínas bacterianas. Além disso, sabe-se que as proteínas exportadas representam uma fração importante dos determinantes moleculares de virulência de uma série de agentes patogênicos (Brooks & Buchanan, 2007; Stavrinides et al., 2008; Sibbald & van Dijl, 2009).

Neste estudo, uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator sigma alternativo σ^E foi mais sensível que a linhagem parental a condições de estresse de superfície celular, de estresse ácido e estresse nitrosativo. Interessantemente, um papel para o fator σ^E na resistência a este último tipo de estresse ainda não tinha sido sugerido em outra bactéria. O estresse nitrosativo é gerado *in vivo* pela ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) no compartimento fagossômico onde residem as bactérias intracelulares (Nathan & Shiloh, 2000). O óxido nítrico (NO \cdot) é um radical altamente reativo que pode inibir o crescimento bacteriano através da modificação de múltiplos alvos celulares, incluindo os grupos tiol (-SH) das proteínas, os grupos heme, as bicamadas lipídicas e até mesmo o DNA (Wink et al., 1991; Richardson et al., 2009). Adicionalmente, a combinação do NO \cdot com espécies reativas de oxigênio (ROS), também geradas durante a infecção, pode levar à formação de agentes com maior potencial antibacteriano, como o peroxinitrito (ONOO \cdot) (Nathan & Shiloh, 2000; Omsland et al., 2008).

Quando comparamos os proteomas extracelulares das linhagens tipo-selvagem e mutante ($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*, utilizando a estratégia para análise do exoproteoma implementada neste estudo, foi possível identificar variações que ajudaram a entender a resistência diferencial das duas linhagens ao estresse nitrosativo *in vitro*. Além disso, experimentos de infecção de camundongos deficientes para a enzima óxido nítrico sintase indutível (nocautes iNOS $^{-/-}$) foram sugestivos de que o fator σ^E contribui também para a resistência ao estresse nitrosativo *in vivo* e para a virulência de *C. pseudotuberculosis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Durante o período de desenvolvimento desta tese de doutorado, nosso grupo de pesquisa foi convidado a contribuir com três trabalhos de revisão sobre a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* para importantes meios de divulgação sobre doenças infecciosas veterinárias. Eu participei diretamente da elaboração destes trabalhos, os quais são apresentados a seguir.

O item 2.1 traz um trabalho de revisão publicado no periódico francês *Veterinary Research*, o qual apresenta características microbiológicas gerais sobre a bactéria *C. pseudotuberculosis* além de discutir os principais determinantes moleculares de virulência deste patógeno já conhecidos e suas contribuições para a patogênese da linfadenite caseosa (LC).

No item 2.2 é apresentado um artigo de revisão publicado no periódico inglês *Expert Review of Vaccines*, o qual faz um apanhado do conhecimento atual sobre os fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* e sobre os mecanismos imunológicos já identificados de resposta do hospedeiro a este patógeno. Além disso, é discutido o impacto deste conhecimento no futuro desenvolvimento de vacinas contra a infecção por esta bactéria.

Finalmente, o item 2.3 traz um capítulo escrito a convite do editor do livro americano *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (4th Edition)*, o qual discute características gerais sobre as infecções de animais por bactérias dos gêneros *Corynebacterium* e *Arcanobacterium*. Especial atenção é dedicada às infecções causadas pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

2.1 Artigo de Revisão

Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. ***Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.*** *Veterinary Research*, v.37, p.201 - 218, 2006.

Review article

***Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence**

Fernanda Alves DORELLA^a, Luis Gustavo Carvalho PACHECO^a, Sergio Costa OLIVEIRA^b, Anderson MIYOSHI^a, Vasco AZEVEDO^{a*}

^a Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratório de Imunologia de Doenças Infeciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

(Received 2 February 2005; accepted 4 November 2005)

Abstract – *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA), a common disease in small ruminant populations throughout the world. Once established, this disease is difficult to eradicate because drug therapy is not effective and because the clinical detection of infected animals is of limited efficiency. We reviewed the microbiological, biochemical and taxonomic features of *C. pseudotuberculosis*, general aspects of infection, the main virulence determinants and currently available commercial vaccines. We also examined the current molecular strategies for the study of virulence in *C. pseudotuberculosis*, including the latest research on the identification of novel virulence factors and genes, which will help us to better understand the biology of this microorganism. This knowledge may also contribute to the development of improved CLA vaccines, including subunit and DNA-based types, as well as to improve the diagnosis, treatment and control of this disease.

***Corynebacterium pseudotuberculosis* / caseous lymphadenitis / pathogenesis / virulence / vaccine**

Table of contents

1. Introduction	202
2. Microbiological, biochemical and taxonomic features of <i>C. pseudotuberculosis</i>	202
2.1. Microbiological aspects	202
2.2. Biochemical properties.....	203
2.3. Antimicrobial susceptibility	203
2.4. Taxonomy	206
3. General aspects of <i>C. pseudotuberculosis</i> infection	207
3.1. Transmission	207
3.2. Human cases.....	207
3.3. Caseous lymphadenitis	207

* Corresponding author: vasco@icb.ufmg.br

3.4. Epidemiology of CLA	208
3.5. Diagnosis and control of CLA	208
4. From proteins to DNA: Commercial and experimental vaccines	208
4.1. Commercial vaccines	208
4.2. Experimental vaccines	210
5. Determinants of virulence	210
5.1. Phospholipase D	210
5.2. Toxic cell-wall lipids	211
5.3. New candidates	211
6. Molecular strategies for the study of virulence in <i>C. pseudotuberculosis</i>	211
6.1. Identification of immunodominant peptides	211
6.2. Generation of mutants	212
7. Future directions	212

1. INTRODUCTION

The genus *Corynebacterium* belongs to a suprageneric group of actinomycetes that also includes the genera *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* [46, 87, 100, 102]. These gram-positive bacteria (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species), termed the CMN group, constitute a very heterogeneous group; however, most of the species share particular characteristics, such as: (i) a specific cell wall organization, mainly characterized by the presence of a huge polymer complex composed of peptidoglycan, arabinogalactan and mycolic acids [5, 26–28, 39, 45, 48] and (ii) high G+C content (47–74%) [39, 40, 43, 80]. The genomes of several species of this group have already been completely sequenced; this fact reflects the considerable medical, veterinary and biotechnological importance of these organisms (Tab. I).

Corynebacterium pseudotuberculosis is an important animal pathogen. It is the etiological agent of a disease that is commonly called caseous lymphadenitis (CLA) or cheesy gland [114]. This disease is found in all the world's major sheep and goat production areas, causing significant economic losses [85, 114].

In this review, we present the main microbiological characteristics of *C. pseudotuberculosis*. Bacterial virulence determinants, including previously reported vir-

ulence factors and recently identified molecules, are discussed, with emphasis on the molecular strategies that have been used to identify and study such determinants. The aspects regarding CLA are also covered, focusing on the currently-available commercial and experimental vaccines.

2. MICROBIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND TAXONOMIC FEATURES OF *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

2.1. Microbiological aspects

C. pseudotuberculosis was isolated from bovine farcy in 1888 by Nocard. Preisz, in 1894, was the first to completely describe this microorganism and to observe its resemblance to the diphtheria bacillus. Synonyms for *C. pseudotuberculosis* were *Bacillus pseudotuberculosis ovis*, *Bacillus pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ovis* and Preisz-Nocard bacillus [59, 72].

This microorganism is a facultative intracellular pathogen that exhibits pleomorphic forms, such as coccoids and filamentous rods, ranging in size from 0.5 μm to 0.6 μm by 1.0 μm to 3.0 μm [17, 28, 72, 97]. It is a non-sporulating, non-capsulated and non-motile bacterium; however, it has fimbriae [17, 46, 72]. This bacterium is a facultative anaerobe and grows best at

37 °C, at a pH of 7.0 to 7.2 [17, 72, 97]. It grows sparse initially on the agar surface and then becomes organized in clumps or in palisades, taking on a cream to orange coloration; colonies are dry, opaque and concentrically ringed. Growth in fluid medium develops as a granular deposit with a surface pellicle [17, 72, 77]. Haemolysis on blood agar is variable, but large zones develop in the presence of *Rhodococcus equi* [17]. *C. pseudotuberculosis* toxin inhibits the action of staphylococcal β -lysin [59].

C. pseudotuberculosis stains Gram-positive and when stained by Albert's or Neisser's method, volutin granules can be visualized. These metachromatic granules are clearly observed in the bacillary form, but are absent from coccoid cells; they contain high-energy phosphate reserves [46, 72].

2.2. Biochemical properties

Cell wall peptidoglycan is based on *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-DAP). Arabinose and galactose are major cell wall sugars. Short-chain mycolic acids (corynomycolic acids, 22–36 carbon atoms) are present [59, 94, 97]. Biochemical reactions of *C. pseudotuberculosis* isolates vary considerably, mainly in their fermenting ability [72, 100, 105]. All strains produce acid, but not gas, from many carbon sources, including glucose, fructose, maltose, mannose, and sucrose [17, 53, 59, 72]. This bacterium is phospholipase D and catalase positive, oxidase negative, and it is beta-hemolytic [59, 77, 100]. Strains isolated from small ruminants generally do not reduce nitrate [17, 72, 100, 114].

A well-established biochemical test for coryneform bacteria identification is the API Coryne system (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France). This method consists of 21 biochemical tests; it can be performed in 24–48 h. The test contains 20 tubes containing substrates that allow for 11 enzyme tests (pyrazinamidase,

pyrrolidonyl arylamidase, β -galactosidase, alkaline phosphatase, α -glucosidase, *N*-acetylglucosaminidase, β -glucuronidase, and nitrate reduction and gelatin, urea and esculin hydrolysis) and eight carbohydrate fermentation tests (glucose, ribose, D-xylose, mannitol, maltose, lactose, sucrose and glycogen). This system is more reliable and rapid when it is compared with standard identification methods (API-bioMérieux, Inc.). A summary of general biochemical properties of *C. pseudotuberculosis* is presented in Table II.

2.3. Antimicrobial susceptibility

The susceptibility pattern of *C. pseudotuberculosis* to antimicrobial agents varies among isolates obtained from various sources [28, 37, 66]. Muckle and Gyles [77], in a study of 26 strains isolated from lesions of caseous lymphadenitis in goats, reported that all strains were susceptible to the antibiotics ampicillin, chloramphenicol, lincomycin, gentamicin, tetracycline, penicillin G and sulfamethoxazole-trimethoprim. Only three isolates were susceptible to neomycin, and all strains were resistant to streptomycin. Garg et al. [40] reported strains of *C. pseudotuberculosis* that were strongly resistant to penicillin but susceptible to neomycin. A strain highly resistant to streptomycin (500 μ g/mL) was observed in a study of 22 isolates of *C. pseudotuberculosis* from sheep and goat abscesses [90]. Minimal inhibitory concentration (MIC) values for all isolates were similar for the various antimicrobial agents. Later studies also indicated a similarity of MIC values among strains [1, 29, 60]. However, Fernández et al. [35] found higher MIC values for several antimicrobial agents, in an analysis of corynebacteria isolated from ewe mastitis.

Olson et al. [82] grew *C. pseudotuberculosis* as a biofilm, in an attempt to reproduce the environment of a natural infection. They observed that this bacterium was highly resistant to all the drugs that they tested under such growth conditions.

Table 1. The main representatives of the CMN group.

Representative	Status	Importance	Sequenced strain	Genome size (Mbp)	GC contents (%)	Reference
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Complete	Causal agent of the disease diphtheria in humans	NCTC 13129	2.488	53	[20]
<i>Corynebacterium efficiens</i>	Complete	Production of glutamate and other amino acids and compounds	YS-314	3.147	63	[81]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Complete	Production of glutamate, other amino acids (L-lysine) and compounds	ATCC 13032	3.309	53	[55]
<i>Mycobacterium avium</i>	In progress	Causes tuberculosis in birds and disseminated infections in immunocompromized humans (the elderly, children, and especially patients with AIDS)	104	5.480	68	http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Complete	Causative agent of Johne's disease, or paratuberculosis, a chronic severe intestinal infection. The disease affects domestic and free-ranging ruminants, but has also been reported in primates, rabbits, stoats and foxes	k10	4.829	69	[88]
<i>Mycobacterium bovis</i>	Complete	Causative agent of classic bovine tuberculosis, but it can also cause the disease in humans, especially if contaminated milk is consumed without prior pasteurization. This is a fully virulent strain	AF2122/97	4.345	65	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/ [41]
<i>Mycobacterium bovis</i>	In progress	Causative agent of classic bovine tuberculosis, but it can also cause the disease in humans. This is the strain that is used to produce BCG (Bacille de Calmette et Guérin) vaccine, a well-known tuberculosis vaccine	BCG	4.400	57	http://www.pasteur.fr/recherche/umites/L-gmb/mycogenomics.htm
<i>Mycobacterium leprae</i>	Complete	Causative agent of human leprosy	TN	3.268	57	[38]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	In progress	Generally non-pathogenic mycobacterium capable of causing soft tissue lesions. This bacterium was initially isolated from human smegma. It is associated with soft tissue lesions following trauma or surgery	MC2 155	7.040	57	http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html

Table I. Continued.

Representative	Status	Importance	Sequenced strain	Genome size (Mbp)	GC contents (%)	Reference
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Complete	Causative agent of tuberculosis. It is highly contagious, infecting approximately 80% of the patient's social contacts	CDC1551	4.403	65	[36]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Complete	Causative agent of tuberculosis. Unlike some clinical isolates, it retains full virulence in animal models of tuberculosis and is susceptible to drugs and receptive to genetic manipulation	H37Rv	4.411	65	[25]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	In progress	Causative agent of tuberculosis. It was subsequently found that this strain is one of the most wide-spread and virulent <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains	210	4.400	57	http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html
<i>Nocardia farcinica</i>	Complete	The causative agent of nocardiosis, affecting the lung, central nervous system, and cutaneous tissues of humans and animals. This species exhibits a greater degree of virulence than the more common <i>Nocardia asteroides</i>	IFM 10152	6.021 (Chromosome) 0.184 (Plasmid pNF1) 0.087 (Plasmid pNF2)	70 67 68	[56]
<i>Rhodococcus</i> sp.	In progress	Microbe capable of degrading a wide variety of polychlorinated biphenyls	RHA1	9.700		http://www.rhodococcus.ca

Table II. Biochemical characteristics of *C. pseudotuberculosis*.

Biochemical characteristics			
Acid production		Hydrolysis	
Glucose	+	Esculin	–
Arabinose	d	Hippurate	–
Xylose	–	Urea	+
Rhamnose	–	Tyrosine	–
Fructose	+	Casein	–
Galactose	+		
Mannose	+	Phosphatase	+
Lactose	–	Pyrazinamidase	–
Maltose	+	Methyl red	+
Sucrose	d	Nitrate reduction	d
Trehalose	–	Catalase	+
Raffinose	–	Oxidase	–
Salicin	–	Lipophilism	–
Dextrin	d		
Starch	–		

+: more than 90% are positive; d: 21–89% are positive; –: more than 90% are negative or resistant.

2.4. Taxonomy

Classification of *C. pseudotuberculosis* was originally based on morphological and biochemical characteristics [59, 77]. Nitrate reductase production was used by Biberstein et al. [8] to distinguish the *equi* biovar (isolated from horses and cattle; nitrate reduction positive) from the *ovis* biovar (isolated from sheep and goats; nitrate reduction negative). Later, Songer et al. [100] reached the same conclusion using restriction endonuclease (*EcoRV* and *PstI*) analyses of chromosomal DNA, and based on nitrate reduction data. More recently, the same result was also observed with restriction fragment length polymorphisms of 16S-rDNA [29, 105, 111]. Connor et al. [28] used pulsed-field gel electrophoresis, associated with biochemical analysis, for the characterization of *C. pseudotuberculosis* isolates.

A close relationship between *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* was suggested by the fact that these organisms are unique among the corynebacteria in producing phospholipase D [15, 44]. Moreover, some strains of *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* can produce diphtheria toxin (DT). Furthermore, some non-toxigenic strains are converted to toxigeny (DT production) by β -phages from toxinogenic *C. diphtheriae* [15, 23, 24, 44].

Molecular methods, including nucleic acid hybridization and 16S rRNA gene sequence analysis, have been used to determine the degree of relatedness of many different corynebacterial species and strains [54, 62, 95, 107]. Riegel et al. [95] found that some strains of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* belong to a monophyletic group, based on phylogenetic analysis of small-subunit rDNA sequences that are only found in the CMN group. They also

concluded that the *equi* and *ovis* biovars of *C. pseudotuberculosis* should not be classified as subspecies, due to their high genomic similarity. In two other independent studies [54, 107], *C. pseudotuberculosis* was found to be closely related to *C. ulcerans*.

More recently, analysis of partial gene sequences from the β -subunit of RNA polymerase (*rpoB*) has been shown to be more accurate for the identification of *Corynebacterium* species than analyses based on 16S rDNA [61, 62]. This method has also been successfully used to identify mycobacterial species [63]. Although the *rpoB* gene is a powerful identification tool, many authors propose that it may be used to complement the 16S rRNA gene analysis in the phylogenetic studies of *Corynebacterium* and *Mycobacterium* species [61–63, 74]. We have constructed a phylogenetic tree based on *rpoB* gene sequences of reference strains from the CMN group (Fig. 1). Based on this phylogenetic tree, we can observe a clear relationship between *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans*. Moreover, analysis using the *rpoB* gene allowed the identification of the group that these two species belong to, as previously observed [61, 62].

3. GENERAL ASPECTS OF *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* INFECTION

Though *C. pseudotuberculosis* was originally identified as the causative microorganism of CLA in sheep and goats, this bacterium has also been isolated from other species, including horses, in which it causes ulcerative lymphangitis and pigeon fever in cattle, camels, swine, buffaloes, and humans [89, 97, 114, 117].

3.1. Transmission

The potential of *C. pseudotuberculosis* to survive for several weeks in the environment likely contributes to its ability to spread within a herd or flock [4, 117].

Transmission among sheep or goats occurs mainly through contamination of superficial wounds, which can appear during common procedures, such as shearing, castration and ear tagging, or through injuries of the animal's bodies generated by other traumatic events. Not infrequently, contaminated sheep cough bacteria onto skin cuts of other sheep, constituting another means of transmission [84, 114]. In cattle, as well as in buffaloes, there is evidence of mechanical transmission of this bacterium by houseflies and by other Diptera, though the natural mechanisms of infection with *C. pseudotuberculosis* are not well documented [97, 116, 117].

3.2. Human cases

Human infection caused by *C. pseudotuberculosis* is a rare event, and most of the reported cases have been related to occupational exposure; one case, diagnosed in 1988, involved the ingestion of raw goat meat and cow milk [89]. About 25 cases of infection of humans with this microorganism have been reported in the literature [67, 73, 89].

Peel et al. [89] reviewed 22 cases, in which infected humans were generally presented with lymphadenitis, abscesses, and constitutional symptoms. Mills et al. [73] described suppurative granulomatous lymphadenitis in a boy, due to contact with contaminated farm animals. Liu et al. [67] reported a *C. pseudotuberculosis* infection in a patient's eye, due to an ocular implant.

In most cases, the patients received antibiotic therapy and the affected lymph nodes were surgically removed [67, 73, 89].

3.3. Caseous lymphadenitis

Caseous lymphadenitis causes significant economic losses to sheep and goat producers worldwide, mainly due to the reduction of wool, meat and milk yields, decreased reproductive efficiencies of affected animals and condemnation of carcasses and skins in

abattoirs [3, 83]. The manifestations of CLA in small ruminants are characterized mainly by bacteria-induced caseation necrosis of the lymph glands. The most frequent form of the disease, external CLA, is characterized by abscess formation in superficial lymph nodes and in subcutaneous tissues. These abscesses can also develop internally in organs, such as the lungs, kidneys, liver and spleen, characterizing visceral CLA [72, 91]. In some cases, the infection produces few obvious clinical signs in the animal, remaining unrecognized until a post-mortem examination has been carried out, making it difficult to obtain definitive data about the prevalence of this disease [3, 17, 83].

3.4. Epidemiology of CLA

Recent epidemiological surveys have examined the prevalence of CLA in different countries [2, 3, 6, 11, 28, 85]. Among flocks surveyed in Australia, the average prevalence of CLA in adult sheep was 26% [85]. Forty-five percent of the farmers interviewed in a study in the United Kingdom had seen abscesses in their sheep; however, this could be an overestimation of CLA prevalence since few farmers had investigated the causes of the abscesses [11]. Twenty-one percent of 485 culled sheep examined in Canadian slaughterhouses had CLA [3]. This disease remains an important subject of veterinary concern throughout the world.

3.5. Diagnosis and control of CLA

Controlling CLA with antibiotics is not an easy task, since viable bacteria stay protected inside abscesses due to the thick capsule that surrounds them [91, 103, 114]. It is generally agreed that the best strategy to control the disease is vaccination of healthy animals, along with the identification/removal of infected animals [13, 71, 84, 114]. However, the difficulties associated with the early clinical identification of infected animals can be a hindrance to such a strategy.

Several serodiagnostic tests have been developed to overcome the problem of clinical identification of CLA, but most have been reported to lack either sensitivity or specificity [14, 16, 70, 71, 104, 114, 118]. Nevertheless, some enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based diagnostic tests have been reported to be effective in control and eradication programs [32, 33, 110]. Recently, ELISA tests to detect gamma interferon (IFN- γ), as a marker of cell-mediated immunity against *C. pseudotuberculosis*, have been developed [71, 86, 93]. The IFN- γ ELISA test appears to be more sensitive than the normal antibody ELISA in detecting prior infection in goats, and it does not seem to be affected by vaccination in sheep [71]. Another novel strategy that holds promise for the diagnosis of CLA is the use of polymerase chain reaction (PCR) tests specific for *C. pseudotuberculosis* to identify bacteria isolated from abscesses [21].

4. FROM PROTEINS TO DNA: COMMERCIAL AND EXPERIMENTAL VACCINES

4.1. Commercial vaccines

Most of the currently-available commercial vaccines for caseous lymphadenitis are combined with vaccines against other pathogens. These include *Clostridium tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi* and *Cl. chauvoei* [85, 91, 103, 114]. These vaccines are based on inactivated phospholipase D (PLD) and are called toxoid vaccines.

Paton et al. [84], in an analysis of the effectiveness of a combined toxoid vaccine against CLA, reported a reduction in the number and size of CLA lung abscesses and a decrease in the spread of this disease within the flock. However, in another study [85], it was reported that although 43% of the farmers applied commercial CLA vaccines, only 12% used them correctly. It was concluded that adjustments in vaccination

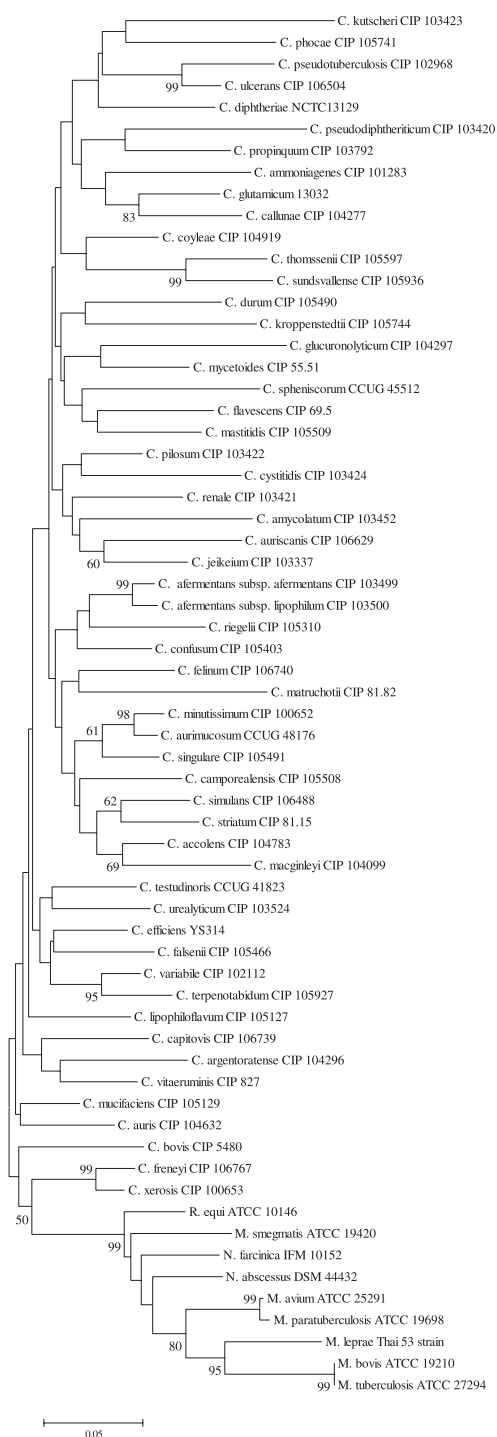


Figure 1. Dendrogram representing the phylogenetic relationships of the CMN group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species) obtained by the neighbor-joining method [96]. The tree was derived from the alignments of *rpoB* gene sequences. The phylogenetic distances were calculated by the software MEGA 3 [64]. The support of each branch, as determined from 1 000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (in percent).

programs would dramatically diminish the prevalence of CLA.

Not all the vaccines licensed for use in sheep can be used to vaccinate goats. Moreover, while the recommended vaccination program for sheep consists of two priming doses in lambs and yearly boosters in adult sheep, revaccination is recommended at six-month intervals in goats [85, 114].

A live attenuated vaccine strain of *C. pseudotuberculosis*, strain 1002, has been licensed for use in Brazil since 2000. It is already being produced industrially and is available in a liquid form that must be administered yearly to the animals, subcutaneously; a lyophilized version is also being developed by the Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (<http://www.ebda.ba.gov.br>). This live vaccine was reported to confer around 83% protection against CLA in goats in experimental assays and in field trials.

4.2. Experimental vaccines

C. pseudotuberculosis Toxminus (pld mutant) has been used as a live bacterial vector to deliver heterologous antigenic proteins [75]. Five heterologous genes (the gene coding for *Mycobacterium leprae* 18-kDa antigen, *Taenia ovis* 45W gene, *Babesia bovis* 11C5 antigen, the *Dichelobacter nodosus* gene encoding mature basic protease (*bprV*) and *Anaplasma marginale* ApH antigen), plus a genetically inactivated analogue of PLD, were used to construct plasmids expressing foreign genes in the Toxminus strain. Three proteins elicited specific antibody responses in experimentally vaccinated sheep. The expression by Toxminus of mature basic protease (*bprV*) of *D. nodosus* fused to the carboxy-terminus of *Mycobacterium leprae* 18-kDa antigen against ovine footrot [76] was also tested. Though the animals were not protected from footrot, this live recombinant vaccine was capable of eliciting a humoral immune response, and it may be capable of successfully delivering a foreign antigen.

Recently, the immune responses of sheep vaccinated with a DNA vaccine expressing the extracellular domain of bovine CTLA-4, fused to HIg and a genetically detoxified phospholipase D (boCTLA-4-HIg- Δ PLD) from *C. pseudotuberculosis* have been investigated [22]. CTLA-4 binds with high affinity to the B7 membrane antigen on antigen-presenting cells (APC), enhancing the humoral immune response to a vaccine antigen. Though the genetically attenuated vaccine was found to be only partially effective against experimental challenge with *C. pseudotuberculosis*, the targeted DNA vaccine provided sheep with a significantly improved antibody response. In order to improve the efficacy of this DNA vaccine, De Rose et al. [31] tested different routes of immunization: (i) intramuscular DNA injection, (ii) subcutaneous DNA injection and (iii) gene gun bombardment. Intramuscular vaccination gave a level of protection similar to that observed with protein vaccination, while subcutaneous and gene gun vaccination did not protect sheep against bacterial challenge.

5. DETERMINANTS OF VIRULENCE

5.1. Phospholipase D

Phospholipase D (PLD) is a potent exotoxin produced by *C. pseudotuberculosis* and it has been considered as the major virulence factor for this bacterium [51, 65].

This exotoxin is a permeability factor that promotes the hydrolysis of ester bonds in sphingomyelin in mammalian cell membranes, possibly contributing to the spread of the bacteria from the initial site of infection to secondary sites within the host [19, 30, 65, 69, 89, 106, 108]. Moreover, it provokes dermonecrotic lesions, and at higher doses it is lethal to a number of different species of laboratory and domestic animals [34, 102]. Damage and destruction of caprine macrophages have been observed during infection with *C. pseudotuberculosis*.

This lethal effect is due to action of PLD [109].

Several of the biological activities of *C. pseudotuberculosis* PLD, as well as its molecular structure, have also been found in sphingomyelinases in the venom of the medically important spider genus *Loxosceles* [7, 10, 30, 102, 108, 112].

The use of an antitoxin has prevented the spread of *C. pseudotuberculosis* within the host; however, it is not able to prevent the development of abscesses [114]. Moreover, vaccination of goats with formalized exotoxin, i.e. with inactive PLD, also prevented the spread of bacteria, following experimental challenge [13].

5.2. Toxic cell-wall lipids

The surface lipids of *C. pseudotuberculosis* have long been described as major factors contributing to its pathogenesis [18, 47, 48, 58]. The toxicity of the extracted lipid material has been demonstrated by the induction of hemorrhagic necrosis following intradermal injection in guinea pigs [58]. Mouse peritoneal macrophages were found to be highly susceptible to the necrotizing action of *C. pseudotuberculosis* surface lipids, but this cytotoxic effect is not observed in rabbit cells [48]. However, infection with *C. pseudotuberculosis* in the guinea pig invariably progresses until death, while guinea pig macrophages are not susceptible to the cytotoxic action of the bacterial lipids [48, 57]. Tashjian et al. [109] observed that *C. pseudotuberculosis* was resistant to killing and digestion by caprine macrophages due to its lipid coat.

A study carried out in mice with 25 isolates of *C. pseudotuberculosis* proposed that there is a direct relationship of the percentage of surface lipids with the induction of chronic abscessation [78].

5.3. New candidates

Recently, it has been proposed that a putative *C. pseudotuberculosis* iron uptake

gene cluster has a role in its virulence [9]. The four genes in this putative operon were identified downstream from the *pld* gene. They were designated as Fe acquisition genes (*fag*) *A*, *B*, *C* and *D*. Since *C. pseudotuberculosis* is an intracellular pathogen, this bacterium must be able to acquire iron from an environment in which this nutrient is scarce. Although there was no alteration in the utilization of iron by a *fagB(C)* mutant in vitro, this mutant had a decreased ability to survive and to cause abscesses in experimentally-infected goats [9].

6. MOLECULAR STRATEGIES FOR THE STUDY OF VIRULENCE IN *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

6.1. Identification of immunodominant peptides

To date, the most widely studied *C. pseudotuberculosis* protein is PLD. It has already been purified, cloned and expressed in *E. coli* [34, 50, 69, 101].

A protective antigen, corynebacterial secreted protease 40 (CP40) [115], has been identified in *C. pseudotuberculosis* by applying a strategy that involves the local immune response, analyzing the specificity of antibodies produced by B cells [113]. Antibody secreting cells (ASC), obtained from induced infections in sheep, produce antibodies with high specificity. These antibodies are used as probes to screen whole-cell antigens of *C. pseudotuberculosis* by immunoblots. CP40 was one of the earliest antigens recognized in immunoblots of sera. ELISA tests confirmed the results obtained with immunoblots, and field trials with this semipurified antigen showed that CP40 was highly protective against experimentally-induced CLA [113].

Some researchers have analyzed and characterized soluble and insoluble proteins that have immunodominant potential [12, 79]. Though many other immunogenic excreted-secreted components have been

described, using immunoblot techniques [86, 87], these proteins have not been identified. However, they reliably detected CLA infection in goats, and they could be used as vaccine components.

6.2. Generation of mutants

Random chemical mutagenesis, with formic acid, was used by Haynes et al. [49] to produce enzymatically-inactive PLD. This analog protein, though inactive, still had immunological activity [49]. Hodgson et al. [51] and McNamara et al. [68] used site-specific mutagenesis to produce *pld* mutants that had reduced ability to establish infection and were unable to disseminate in sheep and goats.

Site-specific amino acid substitution has also been used to generate genetic inactivation of the *pld* gene in two independent experiments. Tachedjian et al. [106] substituted the His20 in the PLD active site with other amino acids, obtaining mutants that were able to produce a genetically-inactivated version of PLD. After analysis of mutant gene expression, two mutants were selected that retained features useful for toxoid vaccine development. In another study, the inactivated protein, in which His20 was substituted by Ser, gave 44% protection in sheep challenged with the bacterium [52].

A mutant of the *C. pseudotuberculosis* *recA* gene was generated by site-specific inactivation [92]. The mutant had its homologous recombination efficiency decreased 8–10 fold. Nevertheless, in vivo analysis revealed that the mutated *recA* gene did not affect the virulence of this bacterium in mice.

Reduction of virulence of *C. pseudotuberculosis* mutants was obtained by Simmons et al. [98]. Allelic exchange was used to generate *aroQ*-attenuated mutants that were unable to cause CLA in murine models. It was suggested that highly attenuated *aroQ* mutants of *C. pseudotuberculosis* could be used as vaccine vectors [99].

The ability of the *fag* genes to be induced by limited iron was studied by transcriptional fusions with the *lacZ* reporter gene, followed by an assay for β -galactosidase activity [9]. The resultant mutants were grown in both iron-rich and iron-limited media. The mutants expressed very low levels of β -galactosidase activity in iron-rich medium and almost three-fold more in iron-limited medium. Although not well expressed in vitro, this putative operon appears to be induced by limited iron.

Our research group has identified 34 insertional mutants of genes coding for fimbrial and transport subunits, and also for hypothetical and unknown function proteins from *C. pseudotuberculosis*, using random transposon mutagenesis with the TnFuZ transposition system [42], a tool that generates transcriptional and translational fusions with the *phoZ* gene (encoding alkaline phosphatase) of *Enterococcus faecalis*¹. This discovery indicates promising target genes that could contribute to the development of attenuated vaccine strains.

7. FUTURE DIRECTIONS

Despite the various molecular strategies that have been employed, efficient tools for the genetic study of *C. pseudotuberculosis* are still scarce. In fact, the main reason for the lack of molecular investigation of this organism is that the genetics of the genus have been little studied with modern techniques, making it difficult to identify and characterize factors that could be involved in virulence [20]. Nevertheless, other representatives of the CMN group are better characterized, and the genetic tools that have been developed could be directly applicable to *C. pseudotuberculosis* in future studies.

¹ Dorella F.A., Estevam E.M., Pacheco L.G.C., Guimarães C.T., Lana U.G.P., Gomes E.A., Miyoshi A., Azevedo V., unpublished results.

ACKNOWLEDGEMENTS

Miyoshi A. and Azevedo V. share the same credit in the senior authorship of this work. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos-01.04.760.00) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil).

REFERENCES

- [1] Adamson P.J., Wilson W.D., Hirsh D.C., Baggot J.D., Martin L.D., Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents, *Am. J. Vet. Res.* 46 (1985) 447–450.
- [2] Al-Rawashdeh O.F., al-Qudah K.M., Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47 (2000) 287–293.
- [3] Arsenaault J., Girard C., Dubreuil P., Daignault D., Galarneau J.-R., Boisclair J., Simard C., Bélanger D., Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, *Prev. Vet. Med.* 59 (2003) 67–81.
- [4] Augustine J.L., Renshaw H.W., Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 713–715.
- [5] Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G., Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications, *J. Biotechnol.* 104 (2003) 55–56.
- [6] Ben Said M.S., Ben Maitigue H., Benzarti M., Messadi L., Rejeb A., Amara A., Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis, *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 79 (2002) 51–57.
- [7] Bernheimer A.W., Campbell B.J., Forrester L.J., Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Science* 228 (1985) 590–591.
- [8] Biberstein E.L., Knight H.D., Jang S., Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Rec.* 89 (1971) 691–692.
- [9] Billington S.J., Esmay P.A., Songer J.G., Jost B.H., Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 208 (2002) 41–45.
- [10] Binford G.J., Cordes M.H.J., Wells M.A., Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure, *Toxicon* 45 (2005) 547–560.
- [11] Binns S.H., Bairley M., Green L.E., Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999, *Vet. Rec.* 150 (2002) 263–268.
- [12] Braithwaite C.E., Smith E.E., Songer J.G., Reine A.H., Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Microbiol.* 38 (1993) 59–70.
- [13] Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L., Morse S.M., Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 1116–1119.
- [14] Brown C.C., Olander H.J., Alves S.F., Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil, *Can. J. Vet. Res.* 51 (1987) 46–49.
- [15] Buck G.A., Cross R.E., Wong T.P., Loera J., Groman N., DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages, *Infect. Immun.* 49 (1985) 679–684.
- [16] Burrell D.H., A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin, *Res. Vet. Sci.* 28 (1980) 234–237.
- [17] Buxton A., Fraser G., *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, 1977, pp. 177–183.
- [18] Carne H.R., Kater J.C., Wickham N., A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*, *Nature* 178 (1956) 701–702.
- [19] Carne H.R., Onon E.O., Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, *Nature* 271 (1978) 246–248.
- [20] Cerdeño-Tárraga A.M., Efstratiou A., Dover L.G., Holden M.T.G., Pallen M., Bentley S.D., et al., The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 6516–6523.
- [21] Çetinkaya B., Karahan M., Atil E., Kalin R., De Baere T., Vanechoutte M., Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR, *Vet. Microbiol.* 2359 (2002) 1–9.
- [22] Chaplin P.J., De Rose R., Boyle J.S., McWaters P., Kelly J., Tennent J.M., Lew A.M., Scheerlinck J.-P.Y., Targeting improves the efficacy of a

- DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6434–6438.
- [23] Cianciotto N., Groman N., A beta-related corynebacteriophage which lacks a *tox* allele but can acquire it by recombination with phage, *Infect. Immun.* 49 (1985) 32–35.
- [24] Cianciotto N., Rappuoli R., Groman N., Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp., *J. Bacteriol.* 168 (1986) 103–108.
- [25] Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., et al., Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537–544.
- [26] Collins M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E., Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 128 (1982) 2503–2509.
- [27] Collins M.D., Falsen E., Akervall E., Sjoden B., Alvarez A., *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. Nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 1449–1454.
- [28] Connor K.M., Quirie M.M., Baird G., Donachie W., Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 2633–2637.
- [29] Costa L.R.R., Spier S.J., Hirsh D.C., Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin, *Vet. Microbiol.* 62 (1998) 135–143.
- [30] Coyle M.B., Lipsky B.A., Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, *Clin. Microbiol. Rev.* 3 (1990) 227–246.
- [31] De Rose R., Tennent J., McWaters P., Chaplin P.J., Wood P.R., Kimpton W., Cahill R., Scheerlinck J.P., Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90 (2002) 55–63.
- [32] Dercksen D.P., ter Laak E.A., Schreuder B.E., Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in The Netherlands, *Vet. Rec.* 138 (1996) 237.
- [33] Dercksen D.P., Brinkhof J.M.A., Dekker-Nooren T., van Maanen K., Bode C.F., Baird G., Kamp E.M., A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats, *Vet. Microbiol.* 75 (2000) 167–175.
- [34] Egen N.B., Cuevas W., McNamara P.J., Sammons D.W., Humphreys R., Songer J.G., Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, *Am. J. Vet. Res.* 50 (1989) 1319–1322.
- [35] Fernández E.P., Vela A.I., Las Heras A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F., Moreno M.A., Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis, *Int. J. Antimicrob. Agents* 18 (2001) 571–574.
- [36] Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., et al., Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5479–5490.
- [37] Foley J.E., Spier S.J., Mihalyi J., Drazenovich N., Leutenegger C.M., Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses, *Am. J. Vet. Res.* 65 (2004) 1734–1737.
- [38] Fsihi H., Cole S.T., The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 909–919.
- [39] Funke G., Lawson P.A., Collins M.D., Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 735–739.
- [40] Garg D.N., Nain S.P.S., Chandiramani N.K., Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats, *Indian Vet. J.* 62 (1985) 805–808.
- [41] Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., et al., The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7877–7882.
- [42] Gibson C.M., Caparon M.G., Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 928–932.
- [43] Goodfellow M., Suprageneric classification of actinomycetes, in: Williams S.T. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, pp. 2333–2343.
- [44] Groman N., Schiller J., Russell J., *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from coryneophage β and *Corynebacterium*

- diphtheriae*, Infect. Immun. 45 (1984) 511–517.
- [45] Hall V., Collins M.D., Hutson R.A., Lawson P.A., Falsen E., Duerden B.I., *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53 (2003) 1065–1068.
- [46] Hard G.C., Electron microscopy examination of *Corynebacterium ovis*, J. Bacteriol. 97 (1969) 1480–1485.
- [47] Hard G.C., Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, J. Med. Microbiol. 5 (1972) 483–491.
- [48] Hard G.C., Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages, Infect. Immun. 12 (1975) 4139–4149.
- [49] Haynes J.A., Tkalcevic J., Nisbet I.T., Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Gene 119 (1992) 119–121.
- [50] Hodgson A.L., Bird P., Nisbet I.T., Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, J. Bacteriol. 172 (1990) 1256–1261.
- [51] Hodgson A.L.M., Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., Radford A.J., Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, Infect. Immun. 60 (1992) 2900–2905.
- [52] Hodgson A.L., Carter K., Tachedjian M., Krywult J., Corner L.A., McColl M., Cameron A., Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D, Vaccine 17 (1999) 802–808.
- [53] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., Irregular, nonsporulating Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994, p. 593.
- [54] Hou X.-G., Kawamura Y., Sultana F., Hirose K., Miyake M., Otsuka Y., Misawa S., Oguri T., Yamamoto H., Ezaki T., Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes, Microbiol. Immunol. 41 (1997) 453–460.
- [55] Ikeda M., Nakagawa S., The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes, Appl. Microbiol. Biotechnol. 62 (2003) 99–109.
- [56] Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M., The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 14925–14930.
- [57] Jolly R.D., The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice, N. Z. Vet. J. 13 (1965) 141–147.
- [58] Jolly R.D., Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, J. Appl. Bacteriol. 29 (1966) 189–196.
- [59] Jones D., Collins M.D., Irregular, nonsporulating Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, pp. 1261–1282.
- [60] Judson R., Songer J.G., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents, Vet. Microbiol. 27 (1991) 145–150.
- [61] Khamis A., Raoult D., La Scola B., rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 3925–3931.
- [62] Khamis A., Raoult D., La Scola B., Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*, J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 1934–1936.
- [63] Kim B.J., Lee S.H., Lyu M.A., Kim S.J., Bai G.H., Kim S.J., Chae G.T., Kim E.C., Cha C.Y., Kook Y.H., Identification of Mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), J. Clin. Microbiol. 37 (1999) 1714–1720.
- [64] Kumar S., Tamura K., Nei M., MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, Brief. Bioinform. 5 (2004) 150–163.
- [65] Lipsky B.A., Goldberger A.C., Tompkins L.S., Plorde J.J., Infections caused by non-diphtheria corynebacteria, Rev. Infect. Dis. 4 (1982) 1220–1235.
- [66] Literák I., Horváthová A., Jahnová M., Rychlík I., Skalka B., Phenotype and genotype of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats, Small Rumin. Res. 32 (1999) 107–111.
- [67] Liu D.T., Chan W.M., Fan D.S., Lam D.S., An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Br. J. Ophthalmol. 89 (2005) 245–246.
- [68] McNamara P.J., Bradley G.A., Songer J.G., Targeted mutagenesis of the phospholipase D

- results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Mol. Microbiol. 12 (1994) 921–930.
- [69] McNamara P.J., Cuevas W.A., Songer J.G., Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology, Gene 156 (1995) 113–118.
- [70] Menzies P.I., Muckle C.A., The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks, Can. J. Vet. Res. 53 (1989) 313–318.
- [71] Menzies P.I., Hwang T.-I., Prescott J.F., Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats, Vet. Microbiol. 100 (2004) 129–137.
- [72] Merchant I.A., Packer R.A., The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), Veterinary bacteriology and virology, The Iowa State University Press, Iowa, 1967, pp. 425–440.
- [73] Mills A.E., Mitchell R.D., Lim E.K., *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis, Pathology 29 (1997) 231–233.
- [74] Mollet C., Drancourt M., Raoult D., *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification, Mol. Microbiol. 26 (1997) 1005–1011.
- [75] Moore R.J., Rothel L., Krywult J., Radford A.J., Lund K., Hodgson A.L., Foreign gene expression in *C. pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector, Vaccine 18 (2000) 487–497.
- [76] Moore R.J., Stewart D.J., Lund K., Hodgson A.L., Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic protease antigen, FEMS Microbiol. Lett. 194 (2001) 193–196.
- [77] Muckle C.A., Gyles C.L., Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Can. J. Comp. Med. 46 (1982) 206–208.
- [78] Muckle C.A., Gyles C.L., Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice, Am. J. Vet. Res. 44 (1983) 1149–1153.
- [79] Muckle C.A., Menzies P.I., Li Y., Hwang Y.T., van Wesenbeeck M., Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vet. Microbiol. 30 (1992) 47–58.
- [80] Navas J., Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes, Microbiologia 12 (1996) 297–304.
- [81] Nishio Y., Nakamura Y., Kawarabayasi Y., Usuda Y., Kimura E., Sugimoto S., Matsui K., Yamagishi A., Kikuchi H., Ikeo K., Gojobori T., Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*, Genome Res. 13 (2003) 1572–1579.
- [82] Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R., Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, Can. J. Vet. Res. 66 (2002) 86–92.
- [83] Paton M.W., Rose I.R., Hart R.A., Sutherland S.S., Mercy A.R., Ellis T.M., Dhaliwal J.A., New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production, Aust. Vet. J. 71 (1994) 47–49.
- [84] Paton M.W., Sutherland S.S., Rose I.R., Hart R.A., Mercy A.R., Ellis T.M., The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep, Aust. Vet. J. 72 (1995) 266–269.
- [85] Paton M.W., Walker S.B., Rose I.R., Watt G.F., Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks, Aust. Vet. J. 81 (2003) 91–95.
- [86] Paule B.J.A., Azevedo V., Regis L.F., Carminati R., Bahia C.R., Vale V.L.C., Moura-Costa L.F., Freire S.M., Nascimento I., Schaer R., Goes A.M., Meyer R., Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting, Vet. Immunol. Immunopathol. 96 (2003) 129–139.
- [87] Paule B.J.A., Meyer R., Moura-Costa L.F., Bahia C.R., Carminati R., Regis L.F., Vale V.L.C., Freire S.M., Nascimento I., Schaer R., Azevedo V., Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Protein Expr. Purif. 34 (2004) 311–166.
- [88] Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V., Bannantine J.P., Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 2675–2681.
- [89] Peel M.M., Palmer G.G., Stacpoole A.M., Kerr T.G., Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review, Clin. Infect. Dis. 24 (1997) 185–191.

- [90] Pepin M., Boisrame A., Marly J., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains, *Ann. Rech. Vet.* 20 (1989) 111–115.
- [91] Piontkowski M.D., Shivvers D.W., Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 (1998) 1765–1768.
- [92] Pogson C.A., Simmons C.P., Strugnell R.A., Hodgson A.L.M., Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development, *FEMS Microbiol. Lett.* 142 (1996) 139–145.
- [93] Prescott J.F., Menzies P.I., Hwang Y.T., An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock, *Vet. Microbiol.* 88 (2002) 287–297.
- [94] Puech V., Chami M., Lemassu A., Lan  elle M.-A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daff   M., Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane, *Microbiology* 147 (2001) 1365–1382.
- [95] Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Pr  vost G., Jehl F., Christen R., Monteil H., Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1995) 271–276.
- [96] Saitou N., Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [97] Selim A.S., Oedematous skin disease of buffalo in Egypt, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48 (2001) 241–258.
- [98] Simmons C.P., Hodgson A.L.M., Strugnell R.A., Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3048–3056.
- [99] Simmons C.P., Dunstan S.J., Tachedjian M., Krywult J., Hodgson A.L., Strugnell R.A., Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 474–479.
- [100] Songer J.G., Beckenbach K., Marshall M.M., Olson G.B., Kelley L., Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 49 (1988) 223–226.
- [101] Songer J.G., Libby S.J., Iandolo J.J., Cuevas W.A., Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 58 (1990) 131–136.
- [102] Songer J.G., Bacterial phospholipases and their role in virulence, *Trends Microbiol.* 5 (1997) 156–160.
- [103] Stanford K., Brogden K.A., McClelland L.A., Kozub G.C., Audibert F., The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines, *Can. J. Vet. Res.* 62 (1998) 38–43.
- [104] Sutherland S.S., Ellis T.M., Mercy A.R., Paton M., Middleton H., Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, *Aust. Vet. J.* 64 (1987) 263–266.
- [105] Sutherland S.S., Hart R.A., Buller N.B., Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms, *Vet. Microbiol.* 49 (1996) 1–9.
- [106] Tachedjian M., Krywult J., Moore R.J., Hodgson A.L., Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene, *Vaccine* 13 (1995) 1785–1792.
- [107] Takahashi T., Mori Y., Kobayashi H., Ochi M., Kikuchi N., Hiramune T., Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 649–655.
- [108] Tambourgi D.V., Da Silva M.S., Billington S.J., Goncalves De Andrade R.M., Magnoli F.C., Songer J.G., Van Den Berg C.W., Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases, *Immunology* 107 (2002) 93–101.
- [109] Tashjian J.J., Campbell S.G., Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 690–693.
- [110] ter Laak E.A., Bosch J., Bijl G.C., Schreuder B.E., Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep, *Am. J. Vet. Res.* 53 (1992) 1125–1132.
- [111] Vanechoutte M., Riegel P., de Briel D., Monteil H., Verschraegen G., De Rouck A., Claeys G., Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus

- Corynebacterium*, Res. Microbiol. 146 (1995) 633–641.
- [112] van Meeteren L.A., Frederiks F., Giepmans B.N.G., Pedrosa M.F.F., Billington S.J., Jost B.H., Tambourgi D.V., Moolenaar W.H., Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine, J. Biol. Chem. 279 (2004) 10833–10836.
- [113] Walker J., Jackson H.J., Eggleton D.G., Meeusen E.N.T., Wilson M.J., Brandon M.R., Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis, Infect. Immun. 62 (1994) 2562–2567.
- [114] Williamson L.H., Caseous lymphadenitis in small ruminants, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17 (2001) 359–371.
- [115] Wilson M.J., Brandon M.R., Walker J., Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kDa antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Infect. Immun. 63 (1995) 206–211.
- [116] Yeruham I., Braverman Y., Shpigel N.Y., Chizov-Ginzburg A., Saran A., Winkler M., Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies, Vet. Q. 18 (1996) 87–89.
- [117] Yeruham I., Friedman S., Perl S., Elad D., Berkovich Y., Kalgard Y., A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd, Vet. Dermatol. 15 (2004) 315–320.
- [118] Zaki M.M., The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection, Res. Vet. Sci. 9 (1968) 489–493.

2.2 Artigo de Revisão

Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R. W., Meyer, R., Miyoshi, A, Azevedo, V. **Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development.** *Expert Review of Vaccines*, v.8, p.205 - 213, 2009.

2.3 Capítulo de livro

Moore, R.; Miyoshi, A.; Pacheco, L.G.C.; Seyffert, N.; Azevedo, V. *Corynebacterium and Arcanobacterium. In. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th Edition.* Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., Thoen, C.O. (Ed.). Wiley-Blackwell, USA:2010. 704 p. (no prelo). ISBN: 978-0-8138-1237-3

Texto completo apresentado no Anexo II desta tese.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Com base na hipótese de que fatores sigma de função extra-citoplasmática (σ^{ECF}) regulam proteínas exportadas de *C. pseudotuberculosis* em resposta às condições de estresse do ambiente externo e contribuem para a virulência desta bactéria, foi elaborado o principal objetivo deste trabalho:

- Identificar fatores σ^{ECF} no Genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* e avaliar seus papéis na resistência ao estresse ambiental, na regulação do proteoma extracelular e na virulência deste patógeno.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- 1- Identificar e caracterizar molecularmente os fatores σ^{ECF} da bactéria *C. pseudotuberculosis*.
- 2- Gerar linhagens mutantes ($\Delta\sigma^{ECF}$) de *C. pseudotuberculosis*, com interrupções em genes de fatores σ^{ECF} específicos.
- 3- Comparar a resistência das linhagens tipo-selvagem (wt) e mutantes ($\Delta\sigma^{ECF}$) a diferentes condições de estresse *in vitro*.
- 4- Implementar uma estratégia proteômica para comparação em larga escala dos proteomas extracelulares (exoproteomas) de diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* e gerar um mapa de referência do exoproteoma desta bactéria.
- 5- Comparar os exoproteomas das linhagens wt e $\Delta\sigma^{ECF}$ de *C. pseudotuberculosis*, crescidas sob condições normais ou submetidas a condições de estresse específicas.
- 6- Avaliar a capacidade das linhagens wt e $\Delta\sigma^{ECF}$ de infectar macrófagos em cultura.
- 7- Infectar experimentalmente camundongos C57BL/6 com as linhagens wt e $\Delta\sigma^{ECF}$ de *C. pseudotuberculosis*, a fim de comparar a persistência da infecção e a virulência das bactérias.
- 8- Infectar experimentalmente camundongos nocaute para a enzima óxido nítrico sintase ($iNOS^{-/-}$), a fim de avaliar *in vivo* o papel dos fatores σ^{ECF} na resistência ao estresse nitrosativo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens tipo-selvagem 1002 (Meyer et al., 2002) e C231 (Simmons et al., 1998), e as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis* foram rotineiramente cultivadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI) ou BHI 1,5% ágar, a 37°C, por 48-72 horas. Para os experimentos de resistência ao estresse e para extração de proteínas extracelulares, as linhagens foram crescidas em meio quimicamente definido (MQD), como previamente descrito (Tab. 4.1) (Moura-Costa et al., 2002). Quando necessário, o antibiótico canamicina foi acrescentado ao meio de cultura a 25 µg/ml. As linhagens Top10 ou DH5α de *Escherichia coli* foram utilizadas para todos os procedimentos de clonagem e os antibióticos utilizados foram ampicilina (100 µg/ml) ou canamicina (50 µg/ml).

Tabela 4.1 – Meio quimicamente definido para cultivo de *C. pseudotuberculosis*.

Tampão Fosfato (g/L)		Vitaminas (g/L)		Aminoácidos (g/L)	
				Arginina	0,0632
				Cisteína	0,0120
Na ₂ HPO ₄	12,93	Pantotenato de Ca	0,0040	Histidina	0,0210
KH ₂ PO ₄	2,55	Cloreto de Colina	0,0040	Isoleucina	0,0263
NH ₄ Cl	1,00	Ácido Fólico	0,0040	Leucina	0,0262
CaCl ₂	0,02	Inositol	0,0080	Lisina	0,0363
MgSO ₄	0,20	Niacinamida	0,0040	Metionina	0,0076
Glicose	12,00	Piridoxal	0,0040	Fenilalanina	0,0165
		Riboflavina	0,0004	Treonina	0,0238
		Tiamina HCl	0,0040	Triptofano	0,0051
				Tirosina	0,0180
				Valina	0,0234
				Alanina	0,0089
				Asparagina	0,0132
				Ác. Aspártico	0,0133
				Ac.Glutâmico	0,0133
				Glicina	0,0075
				Serina	0,0105

ADAPTADO: Moura-Costa et al., 2002.

4.2 Identificação e caracterização dos fatores σ ECF

Análises bioinformáticas foram realizadas para identificar fatores σ ECF nas seqüências genômicas das bactérias *Corynebacterium diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens* e *Mycobacterium tuberculosis*. As seqüências obtidas foram alinhadas e as

regiões que apresentaram maior conservação foram delimitadas. Iniciadores com posições degeneradas foram desenhados com base nestas seqüências conservadas (Tab. 4.2). As regiões internas conservadas dos fatores σ ECF da *C. pseudotuberculosis* foram amplificadas por PCR, purificadas de géis de agarose, clonadas em vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) e seqüenciadas, de acordo com protocolos padronizados (Sambrook & Russell, 2001) e recomendações de fabricantes. Novos iniciadores foram desenhados para sequenciar as regiões 5´ e 3´ dos genes à partir de DNA genômico, como descrito (Dorella et al., 2006b).

Adicionalmente, um trabalho de geração e caracterização de GSSs (*Genome Survey Sequences*) de *C. pseudotuberculosis* realizado pelo nosso grupo de trabalho (D'Afonseca et al., 2009) permitiu a identificação de um outro fator sigma ECF no genoma desta bactéria, σ^K , o qual também foi isolado e clonado como descrito anteriormente.

Tabela 4.2 – Iniciadores utilizados para amplificação dos fatores σ ECF

Gene alvo	Fragmento esperado	Iniciador 5´-3´
<i>sigE</i>	491 pb	sigEcons1: GGM <u>ACC</u> GCAGCD <u>TT</u> TCGACGC sigEcons2: CGTCC <u>RC</u> GGTGR <u>AT</u> WCGGGA
<i>sigH</i>	470 pb	sigHcons1: CCV <u>Y</u> TGCTCGAY <u>CAR</u> CTCTAYG sigHcons2: CTGTTTTCTTCCACG <u>R</u> TGGA
<i>sigD</i>	371 pb	sigDcons1: GADGATGTDGCY <u>CAR</u> G <u>AR</u> AT <u>Y</u> TG sigDcons2: GCM <u>K</u> DTGY <u>TG</u> S <u>G</u> C <u>S</u> AC <u>M</u> CG
<i>sigK</i>	530 pb	sigK-F: CTTTCCGTTGTAGAGTTACCGGTC sigK-R: TAATCCATCTCTGACCCAGG

D = A+T+G. K = T+G. M = A+C. R = A+G. S = C+G. V = A+C+G. Y = C+T. W = A+T.

Após a finalização do Projeto Genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais, em 2009, novos fatores sigma ECF desta bactéria foram identificados utilizando as ferramentas bioinformáticas disponíveis no banco MiST2 (*Microbial Signal Transduction database* – disponível em: <http://mistdb.com/>), como descrito (Staron´et al., 2009; Ulrich & Zhulin, 2010).

4.3 Geração de linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*

Versões truncadas das regiões codificadoras dos fatores σ ECF, previamente clonadas em vetor pCR[®]2.1-TOPO[®], foram sub-clonadas no plasmídeo pk18*mobsacB*, um vetor desenvolvido para geração de mutantes de bactérias do gênero *Corynebacterium* através de eventos de recombinação homóloga dupla (Schafer et al., 1994). Os plasmídeos construídos foram transformados em *C. pseudotuberculosis* por eletroporação (Dorella et al., 2006c) e a seleção de bactérias mutantes seguiu protocolo descrito previamente (Schafer et al., 1994). Alternativamente, os plasmídeos pCR[®]2.1-TOPO[®] contendo os fragmentos dos fatores σ foram diretamente transformados em *C. pseudotuberculosis* a fim de gerar linhagens mutantes por eventos de recombinação homóloga simples, como descrito (Miyoshi et al., 2002). Seleção de clones recombinantes foi realizada em meio contendo o antibiótico canamicina (*kan*) a 25 μ g/ml.

4.4 Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante 1002(Δ *sigE*) de *C. pseudotuberculosis*

A confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante 1002(Δ *sigE*) foi realizada através de ensaios de PCR e análises de *Southern blot*. Para isto, os DNAs genômicos das linhagens tipo-selvagem e mutante foram extraídos de acordo com um protocolo previamente padronizado no nosso laboratório (Pacheco et al., 2007).

A tabela 4.3 apresenta os iniciadores utilizados nas reações de PCR. As amplificações foram realizadas utilizando a *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen) ou o kit comercial QIAGEN LongRange PCR kit (Qiagen), de acordo com as recomendações dos fabricantes. As combinações dos diferentes iniciadores são mostradas na Fig. 6.5.

Todos os passos do ensaio de *Southern blot* foram realizados de acordo com protocolos padronizados (Sambrook & Russel., 2001), utilizando DNAs genômicos das diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* digeridos pelas enzimas de restrição *Bgl*III ou *Hind*III. Um fragmento de 492 pb interno ao gene *sigE* desta bactéria foi marcado radioativamente com [α ³²-P]dCTP, utilizando um kit comercial *Random Primers DNA Labeling* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após hibridização

e lavagens da membrana, foi feita a revelação utilizando uma “tela de armazenamento de sinal radioativo”, com leitura num equipamento *Storm*TM (GE Healthcare), como descrito pelo fabricante.

Tabela 4.3 – Iniciadores utilizados para confirmação da mutação na linhagem 1002($\Delta sigE$)

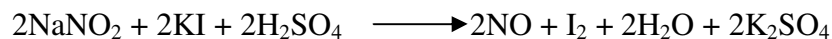
Alvo	Iniciador 5'-3'
<i>sigE</i>	sigE-F: ATGACATCGAACAGTGGTTC
	sigE-R: TTAGTGGGACATCGGTAGG
<i>Kan</i>	Kan-F: ATGATTGAACAAGATGGATTG
	Kan-R: TTAATAATTCAGAAGAACTC
pTOPO [®] 2.1	M13-F: GTAAAACGACGGCCAG
	M13-R: CAGGAAACAGCTATGAC

4.5 Condições de estresse *in vitro*

As diferentes condições de estresse *in vitro* utilizadas para avaliar a resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*, cultivadas em meio quimicamente definido, estão descritas na tabela 4.4. As concentrações utilizadas de cada agente gerador de estresse foram identificadas na literatura disponível para outras bactérias ou otimizadas de acordo com a resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, submetida às diferentes condições nas fases *lag*, exponencial (*log*) e estacionária do crescimento (Tab.4.4; Tab.6.3; Anexo I).

4.6 Implementação de um sistema para avaliação da liberação de NO *in vitro*

O sistema utilizado para quantificar a liberação de óxido nítrico (NO) em cultura pelo agente DETANO está representado na figura 4.1. O eletrodo *Iso-NO* (WPI, Inc.) foi preparado, estabilizado e calibrado, para cada experimento, de acordo com as recomendações do fabricante. Para calibração do sistema, NO foi gerado com reagentes recém preparados, através da seguinte reação química:



As concentrações de NO no sistema em cada passo da calibração foram: 249 nM, 742 nM e 1708 nM. A resposta do sistema (em pA) foi avaliada em intervalos de 5 seg.

Tabela 4.4 - Condições de estresse *in vitro*.

Condição de estresse	Método	Concentrações testadas	Referências
Escassez nutricional	Crescimento com limitação de glicose.	0.15 %	Calamita et al., 2005.
		0.3 %	Este trabalho.
Estresse osmótico	Adição de solução concentrada estéril de NaCl ao meio de cultura.	0.5 M	Nakunst et al., 2007.
		1.0 M	Este trabalho.
		2 M	
		2.5 M	
Estresse oxidativo	Adição de solução comercial de H ₂ O ₂ (30 % em H ₂ O – Sigma-Aldrich) ao meio de cultura.	500µM	Manganelli et al., 2001
		1mM	Park et al., 2008
		2,5 mM	Este trabalho.
		5 mM	
		10 mM	
		25 mM	
		40 mM	
		50 mM	
		100 mM	
150 mM			
200 mM			
Estresse nitrosativo	Adição do agente doador de óxido nítrico (NO) Diethylenetriamine NONOate (DETA/NO) [C ₄ H ₁₃ N ₅ O ₂] (Cayman Chemical) ao meio de cultura. O reagente é preparado em solução alcalina (0.01 M NaOH) e diluído em tampão fosfato pH7.4 no momento do uso.	10µM	Master et al., 2002
		50µM	Ohno et al., 2003
		100µM	Ogawa et al., 2001
		250µM	Omsland et al., 2008
		500µM	Este trabalho.
		1mM	
Estresse ácido	Resuspensão da cultura em meio acidificado com solução concentrada de HCl.	pH 4.0	O'Brien et al., 1996
		pH 4.5	Manganelli et al., 2001
		pH 5.5	Este trabalho.
		pH 6.5	
Estresse alcoólico	Adição de etanol absoluto ao meio de cultura.	1.25 %	Manganelli et al., 2001
		2.5 %	Nakunst et al., 2007.
		5%	Este trabalho.
		10 %	
		15 %	
Estresse térmico	Incubação das culturas a diferentes temperaturas por 30 min.	55 °C	Manganelli et al., 2001
		50 °C	Nakunst et al., 2007.
		4 °C	
Estresse de superfície celular	Adição de SDS (5 % p/v) estéril à cultura.	0.01 %	Gao et al., 2003
		0.05 %	
		0.1 %	
		250 µg/mL	Gao et al., 2003
		500 µg /mL	Park et al., 2008
	750 µg /mL		
	1000 µg /mL		

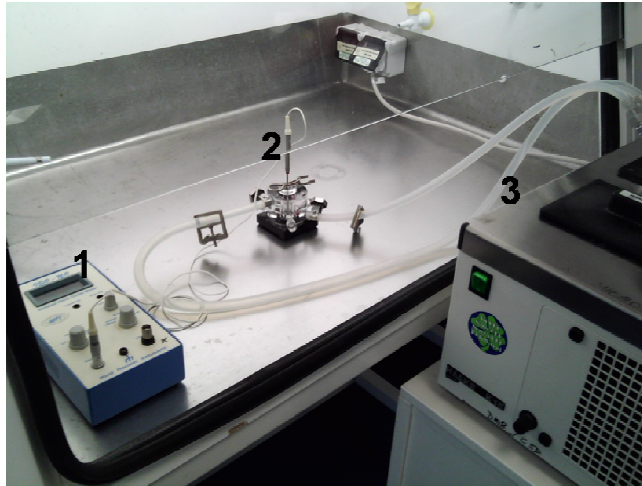


Figura 4.1. Sistema para quantificação da liberação de óxido nítrico (NO) em cultura. Os experimentos foram realizadas utilizando um eletrodo *Iso-NO* (World Precision Instruments, Inc.) (1) estabilizado em meio quimicamente definido numa câmara de 4 portas (2) à qual foi conectado um banho-maria circulador de água (3) para manter a temperatura do sistema constante a 35°C.

4.7 Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* a condições de estresse *in vitro*

Pré-culturas *overnight* (~20-24 hrs) das diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram re-inoculadas (1:100) em meio quimicamente definido, pré-aquecido a 37°C, e incubadas por adicionais 6 hrs, até atingirem o início da fase exponencial de crescimento ($DO_{540nm} = \sim 0.1$; LabSystems *iEMS Absorbance Plate Reader*). Neste ponto, as culturas foram divididas e os diferentes agentes geradores de estresse (Tab. 4.4) foram aplicados a uma alíquota de cada cultura. Seguiu-se então a incubação das culturas, controle e tratadas, por adicionais 24 hrs, a 37°C, com agitação constante. Para monitorar o crescimento das linhagens nas diferentes condições, medidas de densidade ótica a 540 nm das culturas foram realizadas automaticamente a cada 10 min., num equipamento LabSystems *iEMS Absorbance Plate Reader* (Thermo Fisher).

Curvas de crescimento das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* foram plotadas para todas as condições testadas, utilizando o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). Foi feita a integração das áreas sob as curvas (AUC) utilizando o mesmo *software*, e foi calculado o índice de crescimento percentual

das bactérias tratadas em comparação com as bactérias crescidas sob condições normais, de acordo com a seguinte fórmula:

$$GI (\%) = (AUC_{\text{Tratado}} / AUC_{\text{Controle}}) \times 100$$

onde: GI = growth index; AUC = integral da área sob a curva de crescimento das culturas submetidas a condições de estresse (tratado) ou crescidas sob condições normais (controle).

A resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* às diferentes condições de estresse *in vitro* também foi avaliada através de análises de viabilidade bacteriana por plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), como padronizado previamente no nosso grupo (Castro, 2009). Adicionalmente, análises de viabilidade das linhagens crescidas sob condições específicas de estresse foram realizadas por citometria de fluxo, de acordo com as recomendações do fabricante do equipamento CellFacts CFII (CellFacts Instruments, Reino Unido). Basicamente, após submeter as linhagens de *C. pseudotuberculosis* à condição de estresse *in vitro* por 1 hora, foram adicionados a 1 mL de cada cultura, 5 µL do marcador fluorescente de ácidos nucleicos SYTO62 – para enumeração das células bacterianas na amostra – e 2 µL do marcador fluorescente de potencial de membrana DiSC₃ – para avaliar a viabilidade das bactérias (Breeuwer & Abee, 2004). Ambos reagentes foram adquiridos da empresa CellFacts Instruments (Reino Unido). A calibração do equipamento CellFacts CFII e a aquisição das amostras seguiu o protocolo proposto pelo fabricante, utilizando os parâmetros *default* do equipamento relativos aos canais de impedância e de fluorescência (CellFacts Instruments, Reino Unido).

4.8 Infecção de células RAW264.7 em cultura com as linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*

A linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 foi cultivada em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) + 10% soro fetal bovino (SFB), sob atmosfera de 5% CO₂, a 37°C, de acordo com protocolos padronizados

(<http://www.atcc.org>). Após plaqueamento de 5×10^5 células viáveis por poço, em placas de cultura de 12 poços com fundo de vidro (MatTek corporation, EUA), as bactérias das linhagens tipo-selvagem ou mutante de *C. pseudotuberculosis*, marcadas em cultura por 1 hr com TexasRed-succinimidyl ester (Molecular Probes) (0.5 mg / mL em tampão PBS), foram adicionadas à monocamada numa MOI de 5:1. Os macrófagos foram incubados por mais uma hora com as bactérias, antes da visualização por microscopia confocal.

4.9 Avaliação da liberação de NO intracelular por microscopia confocal

Para avaliar a liberação intracelular de NO por macrófagos RAW264.7 infectados por *C. pseudotuberculosis*, as células foram incubadas por 30 min. antes da infecção com $5 \mu\text{g} / \text{poço}$ do reagente DAF-2 diacetate (Cayman Chemical), o qual reage com NO e emite fluorescência na faixa de 512-560 nm, após excitação a 450-490 nm (Ye et al., 2008). A captura de imagens por microscopia confocal foi realizada num microscópio Leica SP5 (Leica), sob um aumento de 40X. Controles experimentais incluíram células não tratadas, ou células incubadas com 1 mM L-NAME (N^{G} -Nitro-L-arginine methyl ester), um inibidor da produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase.

Além da liberação de NO intracelular, também foi avaliada a acidificação do compartimento fagossômico contendo as bactérias. Para isto, $15 \mu\text{M}$ do reagente LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (Molecular Probes) foram adicionados à monocamada de células RAW264.7, 10 minutos antes da infecção por *C. pseudotuberculosis*. Imagens dos compartimentos intracelulares acidificados foram conseguidas com excitação a 405 nm e emissão a 450-500 nm.

4.10 Extração de proteínas extracelulares pelo método TPP

Para a extração das proteínas extracelulares, as linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas separadamente em 500 mL de meio quimicamente definido (MQD) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, até atingirem um ponto no meio do crescimento exponencial ($\text{DO}_{540\text{nm}} = \sim 0.3-0.4$). As culturas foram então centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm para baixar as células e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Após adição de $20 \mu\text{l}$ de coquetel inibidor de proteases (Sigma) as amostras foram filtradas em

filtros de 0.22 μm . Então, foram adicionados sulfato de amônio na concentração de 30% (p/v) e n-butanol no mesmo volume do sobrenadante. O pH da mistura foi ajustado para 4.0. A solução foi misturada, incubada à temperatura ambiente por 1 hora, e centrifugada a 1.350 X g por 10 minutos para a separação em três fases. A precipitação interfacial foi coletada e dissolvida em 1 mL de Tris 20 mM (pH 7.4) acrescido de 10 μl de coquetel inibidor de proteases (Sigma) (Dennison & Lovrien, 1997; Paule et al, 2004). O extrato protéico foi então submetido a diafiltração com colunas Amicon, fator de exclusão de 5 kDa (Millipore).

A dosagem das proteínas extraídas foi realizada pelo método de Bradford, utilizando curva de concentração de BSA como padrão (Simpson, 2003).

4.11 Eletroforese bidimensional (2-D) de proteínas exportadas

Tiras com faixas de pH 3,0-11,0 NL ou 3,0-5,6 NL (Amersham Biosciences) foram re-hidratadas com 150 μg de proteínas extracelulares misturadas ao tampão de re-hidratação [7 M uréia, 2M thiouréia, 2% CHAPS, 2% (v/v) anfólitos (pH 3-11 ou pH 3,5-5), 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, e azul de bromofenol]. A separação em primeira dimensão (focalização isoeétrica - IEF) foi realizada no equipamento Ettan™ IPGphor (Amersham Biosciences). As voltagens e os períodos de duração utilizados para a IEF foram, respectivamente, 150 V por 30 minutos, 300 V por 2 horas, 1500 V por 4 horas e 3500 V por 18 horas. A separação das proteínas na segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12% com uso do aparato de eletroforese Protean Ixi (BioRad Laboratories), a 120 V por 7 horas e 30 minutos em tampão Tris-Glicina-SDS. Os géis foram corados com *Coomassie blue* coloidal e mantidos em solução de etanol a 10% (Simpson, 2003).

4.12 Análise de *spots* protéicos, digestão das proteínas no gel e espectrometria de massa por MALDI-TOF MS/MS

O *software* Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics) foi utilizado para análise comparativa dos *spots* protéicos presentes nos géis 2-D. As proteínas foram então excisadas dos géis, lavadas com acetonitrila a 50% por 5 minutos, e descoradas em

soluções de diferentes concentrações de NH_4HCO_3 . Após a secagem das amostras, as mesmas foram digeridas em solução contendo 1 % tripsina (Promega), a 37°C por 16 horas. Os peptídeos trípticos eluídos em tampão apropriado foram de-salinizados e concentrados utilizando uma ponteira ZipTip C18 (Millipore). Estes peptídeos foram então submetidos a identificação por espectrometria de massa, método MALDI-TOF-MS/MS (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry), como descrito (Simpson, 2003).

4.13 Análises proteômicas qualitativas e quantitativas das proteínas exportadas, utilizando o método LC-MS^E

Para descrição detalhada da metodologia proteômica empregada no presente estudo, veja o Capítulo 5. O protocolo de análises proteômicas pelo método LC-MS^E das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* seguiu o descrito por Patel et al. (2009) com pequenas modificações. Basicamente, as amostras protéicas, após tripsinização, foram separadas e analisadas por um sistema de cromatografia líquida do tipo nano-ACQUITY (Waters Corporation) acoplado a um espectrômetro de massa do tipo Q-Tof Ultima GLOBAL (Micromass). Otimizações foram realizadas para garantir a injeção de aproximadamente 500 ng de cada amostra protéica no sistema. Todas as análises foram realizadas em pelo menos 4 réplicas técnicas de duas réplicas biológicas. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software ProteinLynx Global Server v2.4 (Waters Corporation) contra um banco de dados contendo as sequências protéicas preditas no Genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* (RGMG/RPGP – dados não publicados).

4.14 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fenótipo selvagem, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB – UFMG, e camundongos geneticamente deficientes para a enzima iNOS (iNOS^{-/-}), mantidos em condições estéreis pelo Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB – UFMG. Os animais utilizados tinham entre 6 e 8 semanas de idade.

4.15 Extração e cultivo de células da medula óssea e diferenciação em macrófagos

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 e iNOS^{-/-} são sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures e as tíbias são extraídos. As extremidades proximal e distal destes ossos são cortadas e são injetados 5 mL de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO) por osso.

A suspensão de células obtida é centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos, a 4 °C, e o precipitado é ressuspenso em 12 mL de DMEM suplementado com 10% SFB, 1% de HEPES 1M (GIBCO) e 10% de LCCM (L929 cell conditioned medium), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos).

As amostras obtidas são ressuspenso em 10 mL de meio e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70µm (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, são plaqueadas em placas de cultivo celular e incubadas por duas horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, de forma a obter apenas células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes são coletadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspenso em 2 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células são contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 24 poços na concentração de 5x10⁵ células/mL/poço. As placas então são incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂.

Quatro dias após o plaqueamento das células, são adicionados 100 µL de LCCM por poço e no sétimo dia o meio de cultura é trocado por um novo contendo também 10% de LCCM. No décimo dia de cultura as células estão completamente diferenciadas em macrófagos (Gomes & Appelberg, 2002).

Quando é necessária a ativação dos macrófagos, a citocina recombinante interferon-gama (IFN-γ) (R&D Systems) é adicionada às culturas celulares no nono dia de incubação (20 U por poço).

4.16 Infecção dos macrófagos derivados da medula óssea (BMMØs) e determinação do crescimento intracelular da *C. pseudotuberculosis*

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMMØs) são infectados com as linhagens tipo-selvagem ou mutante de *C. pseudotuberculosis* no décimo dia de cultura.

Para tanto, o meio de cultura é aspirado utilizando pipeta *pasteur* com o auxílio de uma bomba de vácuo e, em seguida, são adicionados 200 µl de suspensão bacteriana por poço (MOI 5:1). Após 2 horas de incubação a 37°C e sob atmosfera de 5% CO₂, cada poço é lavado 4 vezes com 0,5 mL de PBS (pH 7.4). São acrescentados 500 µL de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de HEPES 1M, 10% de LCCM e 100µg/mL de gentamicina (GIBCO) por poço e a placa de cultura é incubada à 37°C, 5% CO₂, por 1 hora. Os poços são lavados novamente e é acrescentado 1 mL por poço de DMEM suplementado, acrescido de 10 µg/mL de gentamicina. A placa é re-incubada a 37°C, 5% CO₂.

No momento da infecção dos BMMØs e após 2, 4 e 8 horas, estas células são lisadas com 10 µl de saponina 10% e diluições seriadas são realizadas em PBS. As diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ são plaqueadas, em duplicata, em meio BHI agar, em todos os tempos analisados.

4.17 Ensaio de viabilidade dos BMMØs após infecção

A viabilidade dos BMMØs derivados de camundongos C57BL/6 ou iNOS^{-/-} após a infecção com as linhagens de *C. pseudotuberculosis* foi avaliada através de ensaios de *Neutral Red*. Em tempos determinados, o meio de cultura foi aspirado dos poços de células infectadas e substituído por 1 mL de meio completo acrescido do corante *Neutral Red* (NR) diluído 1:100. Após 1 hora de incubação a 37°C, 5% CO₂, os poços foram lavados com PBS (pH 7.4) e adicionou-se 1 mL de solução descorante (1:49:50 - ácido acético glacial, água mili-Q, etanol). Quinze minutos depois os sobrenadantes foram transferidos para placas de ELISA (96 poços) e as amostras foram lidas em espectrofotômetro de placa num comprimento de onda de 540 nm. As leituras obtidas para macrófagos não infectados são consideradas como correspondentes a 100% de viabilidade.

4.18 Infecção experimental dos camundongos e análises de persistência

Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10⁶ UFC das linhagens tipo-selvagem ou mutante de *C. pseudotuberculosis*. Nos dias 1 e 3 após a infecção, os

animais foram sacrificados e foram realizadas diluições seriadas dos macerados de linfonodos e de baços, para contagem de UFC desta bactéria.

4.19 Papel dos fatores sigma ECF na resistência ao estresse nitrosativo *in vivo*

Camundongos geneticamente deficientes para a enzima óxido nítrico sintase (nocautes iNOS^{-/-}) foram infectados com 10⁶ UFC das linhagens tipo-selvagem ou mutante de *C. pseudotuberculosis*. Nos dias 1 e 3 após a infecção, os animais foram sacrificados e foram realizadas diluições seriadas dos macerados de linfonodos e de baços, para contagem de UFC desta bactéria.

4.20 Construção de plasmídeos para tentativa de complementação da mutação do fator sigE

A construção dos plasmídeos pLP3 e pLP5 seguiu protocolos padronizados de biologia molecular (Sambrook & Russell, 2001). Os iniciadores PsigE_KpnI-F: 5'-ggtaccggaccttatttccgtcc-3' e PsigE_PstI-R: 5'-gacgtcccgcctcgactctacc 3' foram utilizados para as clonagens no vetor pEC-C18mob2, para gerar o plasmídeo de complementação pLP3. Já os iniciadores Ovex_sigE(KpnI)-F: 5'- ggtacccttgacagcgttttccag -3' e Ovex_sigE(PstI)-R: 5'- ctgcagttagtgggacatcggtag-3' foram utilizados para clonagem no vetor pEC-XC99E, para gerar o plasmídeo de super-expressão pLP5 (Kirchner&Tauch, 2003).

4.21 Análises bioinformáticas e estatísticas

A maioria das análises estatísticas neste estudo foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc) ou Excel (Microsoft). Para a identificação de proteínas extracelulares e análises de expressão diferencial de proteínas através do método LC-MS^E foi utilizado o programa ProteinLynx Global Server v2.4 (Waters Corporation). Os programas SurfG+ (Barinov et al., 2009), SecretomeP v2.0 (Bendtsen et al., 2005a) e TatP v1.0 (Bendtsen et al., 2005b), foram utilizados para predição de localização sub-celular de proteínas (veja Capítulo 5). Demais análises bioinformáticas foram realizadas com uma série de programas padrão, incluindo BLAST, ClustalW, IDT OligoAnalyzer, Blast2GO e COGnitor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE I

Implementação de uma Estratégia Proteômica para Análise Comparativa de Exoproteomas Bacterianos

5.1 Introdução

As proteínas exportadas participam de processos essenciais da relação patógeno-hospedeiro, incluindo adesão, invasão e destruição dos tecidos do organismo hospedeiro, resistência a estresses ambientais durante a infecção, e subversão dos mecanismos de reposta imunológica (Stavrinides et al., 2008; Sibbald & van Dijl, 2009).

Metodologias proteômicas tradicionais para análise das proteínas extracelulares bacterianas (ou do exoproteoma bacteriano) envolvem principalmente a utilização de eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE) seguida pela identificação de proteínas específicas por diferentes métodos (Hansmeier et al., 2007; Malen et al., 2007; Galka et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Dumas et al., 2009). Problemas associados a esta estratégia incluem a dificuldade de processamento de grande número de amostras, o baixo número de proteínas identificadas com confiança e a reprodutibilidade insatisfatória dos experimentos (Roe & Griffin, 2006). O surgimento de novas metodologias de análise proteômica em larga escala oferece alternativas promissoras para o estudo dos exoproteomas bacterianos, uma vez que é possível analisar um grande número de proteínas de uma quantidade maior de linhagens de uma mesma espécie, devido à maior facilidade de reprodução experimental. Além disso, estas novas metodologias permitem identificações mais sensíveis e específicas das proteínas de interesse (Roe & Griffin, 2006; Panchaud et al., 2008).

Uma estratégia de proteômica comparativa em larga escala foi implementada no presente trabalho para estudar o exoproteoma de duas linhagens de *C. pseudotuberculosis* que apresentam fenótipos diferentes de virulência. O método empregado para identificação e quantificação das proteínas extracelulares desta bactéria, conhecido como LC-MS^E, baseia-se na utilização de um protocolo descrito recentemente para aquisição paralela de dados de íons precursores e derivados de todos os peptídeos eluídos numa corrida de cromatografia líquida, através de espectrometria de massa com ionização do tipo *electrospray* (ESI) (Silva et al., 2006; Geromanos et al., 2009).

Além de permitir a caracterização mais completa do exoproteoma de uma bactéria do gênero *Corynebacterium* até o momento (este capítulo), a estratégia implementada também foi aplicada com sucesso para avaliar as alterações do exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* em resposta a condições de estresse específicas (vide Capítulo 6).

5.2 Artigo:

Three-Phase Partitioning Combined with LC-MS^E for Comparative Analysis of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Exoproteome. (Submetido para publicação no periódico *Molecular and Cellular Proteomics* - Online ISSN: 1535-9484)

Resumo

Proteínas exportadas bacterianas são peças importantes da relação patógeno-hospedeiro. Por isto, neste estudo foi realizada uma caracterização completa do proteoma extracelular (exoproteoma) da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes. Um método previamente padronizado para extração de proteínas extracelulares de culturas desta bactéria, conhecido como TPP (do inglês, *Three-phase partitioning*), foi utilizado em conjunto com um novo protocolo de aquisição de dados por espectrometria de massa (LC-MS^E), a fim de identificar e quantificar as exoproteínas. No total, 93 proteínas extracelulares diferentes de *C. pseudotuberculosis* foram identificadas por esta estratégia. O exoproteoma basal desta bactéria foi definido como um conjunto de 44 proteínas comumente observadas em duas linhagens diferentes, isoladas de hospedeiros distintos. Foi possível detectar *in silico* sinais de exportação na maioria (75 %) das proteínas identificadas, quando utilizada a ferramenta bioinformática SurfG+. Além disso, evidências para secreção não-clássica foram detectadas em grande parte das proteínas remanescentes. Análises comparativas dos exoproteomas das duas linhagens nos ajudaram a entender melhor a contribuição de diferentes proteínas exportadas para a virulência da bactéria *C. pseudotuberculosis*. Os resultados deste estudo compõem a análise mais completa do exoproteoma de uma bactéria do gênero *Corynebacterium* até o presente momento.

1 **Three-Phase Partitioning Combined with LC-MS^E for Comparative Analysis of the**
2 ***Corynebacterium pseudotuberculosis* Exoproteome**

3
4 Luis G. C. Pacheco^{†,§}, Susan E. Slade[‡], Núbia Seyffert[§], Anderson Santos[§], Thiago L. P. Castro[§],
5 Wanderson M. Silva[§], Agenor V. Santos[†], Simone G. Santos[#], Luiz M. Farias[#], Maria A. R. Carvalho[#],
6 Adriano M. C. Pimenta[†], Roberto Meyer[#], Artur Silva[¥], Sérgio C. Oliveira[†], Anderson Miyoshi[§],
7 Christopher G. Dowson[‡], and Vasco Azevedo^{§,*}.

8
9 *Departments of [†]Biochemistry and Immunology, [§]General Biology, and [#]Microbiology, Instituto de Ciências*
10 *Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 31.270-901, Brazil.*

11 *[#]Institute of Health Sciences, Universidade Federal da Bahia. Salvador 40.110-902, Brazil.*

12 *[¥]Genome and Proteome Network of the State of Pará. Belém 8607, Brazil.*

13 *[‡]Department of Biological Sciences, University of Warwick. Coventry CV4 7AL, United Kingdom.*

14
15
16 **Running Title:** The Exoproteome of *C. pseudotuberculosis*

17
18
19
20 *** To whom correspondence should be addressed:** Dr. Vasco Azevedo. E-mail: vasco@icb.ufmg.br. Tel /
21 Fax: +55 (31) 3409-2610. Laboratório de Genética Celular e Molecular (Q3-259). Instituto de Ciências
22 Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, Brazil.

27 **Abstract**

28 Bacterial exported proteins represent key components of the host-pathogen interplay. Hence, we sought to
29 characterize the entire exoproteome of the pathogenic bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the
30 etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats. An optimized protocol of three-phase
31 partitioning (TPP) was used to obtain the *C. pseudotuberculosis* exoproteins, and a newly introduced method
32 of data-independent MS acquisition (LC-MS^E) was employed for protein identification and label-free
33 quantification. In total, 93 different extracellular proteins of *C. pseudotuberculosis* were identified with high
34 confidence by this strategy; 44 proteins were commonly identified in two different strains, isolated from
35 distinct hosts, then composing a core *C. pseudotuberculosis* exoproteome. Analysis with the SurfG+ tool
36 showed that more than 75 % (70 / 93) of the identified proteins could be predicted as containing signals for
37 active exportation. Moreover, evidence could be found for probable non-classical export of most of the
38 remaining proteins. Comparative analyses of the exoproteomes of the two strains, in addition to comparison
39 with other experimentally determined corynebacterial exoproteomes, helped us to gain novel insights into the
40 contribution of the exported proteins in the virulence of *C. pseudotuberculosis*. The results presented here
41 compose the most comprehensive coverage of the exoproteome of a corynebacterial species so far.

42

43 **Keywords:** Exoproteome, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, LC-MS(E), SurfG+, Three-Phase
44 Partitioning, label-free quantification

45

46

47

48 **Introduction**

49 *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a facultative intracellular pathogen that belongs to the so-
50 called CMN (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) group, a distinct subgroup of the *Actinobacteria*
51 that also includes other highly important bacterial pathogens, such as *Corynebacterium diphtheriae* and
52 *Mycobacterium tuberculosis*. The most distinctive feature of these Gram-positive bacteria is the unique
53 composition of the cell envelope, characterized by the presence of long chain fatty acids, known as mycolic
54 acids, on the surface of the cell.^{1,2}

55 The main recognizable disease caused by *C. pseudotuberculosis* is caseous lymphadenitis (CLA) in
56 sheep and goats, though this bacterium can also infect several other hosts, including humans.^{1, 3} Typical
57 manifestations of CLA in small ruminants include formation of abscesses in superficial and internal lymph
58 nodes, and in visceral organs.³ Despite the important economic losses caused by this disease to sheep and
59 goat husbandry worldwide, no effective treatment exists, and the efficacy of the currently available vaccines
60 and diagnostic methods is still controversial.⁴

61 The search for *C. pseudotuberculosis* molecular determinants that contribute to CLA pathogenesis
62 lead to the recognition of two exported proteins as the major virulence-associated factors of this bacterium
63 known to date: a secreted phospholipase D (PLD);⁵ and an ABC-type transporter component of an iron
64 uptake system (FagB).⁶ In fact, one might expect that great part of the virulence determinants of *C.*
65 *pseudotuberculosis* would be present in the exoproteome, *i.e.* the entire set of bacterial proteins found in the
66 extracellular milieu.⁷ This is because exported proteins participate in essential steps of the host-pathogen
67 interplay, including: (i) adhesion to host cells; (ii) invasion; (iii) damage to host tissues; (iv) resistance to
68 environmental stresses during infection; and (iv) subversion of the host's immune response mechanisms.⁸⁻¹⁰

69 In two previous attempts to characterize the *C. pseudotuberculosis* exoproteome, our group optimized
70 a protocol of salting out of proteins using sulfate and butanol, known as three-phase partitioning (TPP), for
71 isolation of the extracellular proteins of this bacterium,¹¹ and generated a library of *C. pseudotuberculosis*

72 mutant strains possessing transposon insertions in genes coding for probable exported proteins.¹² In the
73 former study, we were able to determine the optimal conditions for obtaining the best recovery of
74 immunoreactive extracellular proteins of *C. pseudotuberculosis*.¹¹ The second study in turn, enabled us to
75 identify various previously uncharacterized *C. pseudotuberculosis* exported proteins, being that at least two
76 of them are apparently involved in virulence.¹² Now, the very recent conclusion of the *C. pseudotuberculosis*
77 Genome Project by our group, associated to the current availability of high-throughput proteomic
78 technologies, permitted us to perform a much more comprehensive analysis of this bacterium's exoproteome.

79 In this study, we sought to implement a combined approach for comparative exoproteome analysis of
80 different *C. pseudotuberculosis* strains. The strategy included: (i) the previously optimized TPP protocol for
81 isolation of the extracellular proteins;¹¹ (ii) a newly introduced method of data-independent LC-MS
82 acquisition (LC-MS^E) for protein identification and quantification;^{13, 14} and (iii) the recently developed tool
83 SurfG+ for *in silico* prediction of protein sub-cellular localization in Gram-positive bacteria.¹⁵ We believe
84 that the experimental approach used is very suitable for profiling of bacterial exoproteomes, as it shown to be
85 easily applicable to different strains with very good reproducibility. This is an advantage over what is
86 commonly observed for proteomic approaches based on two-dimensional (2D) gel electrophoresis, where
87 there is more variability, but is apparently the method of choice for most of the bacterial exoproteome studies
88 published recently.¹⁶⁻²⁰ Furthermore, the LC-MS^E method provides high subproteome coverage, due to
89 enhanced sensitivity, and allows for label-free quantification of the identified proteins;¹⁴ this latter possibility
90 enables the detection of variations in the exoproteomes of different strains that could be missed by simply
91 profiling the exoproteins, and meets the growing interest in performing physiological proteomic studies of
92 bacteria.^{21, 22}

93 We were able to identify 93 different *C. pseudotuberculosis* extracellular proteins with high
94 confidence by analyzing the exoproteome of two strains isolated from different hosts that presented distinct
95 virulence phenotypes under laboratory conditions.^{23, 24} Most of the identified proteins were predicted *in silico*
96 to have an extracytoplasmic localization. To the best of our knowledge, these results compose the largest

97 inventory of experimentally confirmed exoproteins of a single corynebacterial species to date. Importantly,
98 the comparative exoproteome analyses permitted us to speculate on the probable contributions of different *C.*
99 *pseudotuberculosis* extracellular proteins to the virulence of this bacterium.

100

101 **Experimental Procedures**

102 **Bacterial strains and culture conditions**

103 The strains 1002 and C231 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* were used in this study. Strain
104 1002 was isolated from an infected goat in Brazil and has been shown to be naturally low virulent,^{23, 25} strain
105 C231 was isolated from an infected sheep in Australia, and it showed a more virulent phenotype.²⁴ Species
106 confirmation was performed by biochemical and molecular methods for both strains, as described.²⁶
107 Complete genome sequences of the two strains were generated by a Genome Consortium in Brazil (RGMG -
108 RPGP), and made available for this study (unpublished results).

109 *C. pseudotuberculosis* strains were routinely maintained in Brain Heart Infusion broth (BHI: Oxoid,
110 Hampshire, UK) or in BHI 1.5% bacteriological agar plates, at 37°C. For proteomic studies, strains were
111 grown in a chemically defined medium (CDM) previously optimized for *C. pseudotuberculosis* cultivation.²⁷
112 The composition of the CDM was as follows: autoclaved 0.067 M phosphate buffer [Na₂HPO₄.12H₂O (12.93
113 g/L), KH₂PO₄ (2.55 g/L), NH₄Cl (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0.20 g/L), CaCl₂ (0.02 g/L), and 0.05 % (v/v) Tween
114 80]; 4 % (v/v) MEM Vitamins Solution 100X (Invitrogen); 1 % (v/v) MEM Amino Acids Solution 50X
115 (Invitrogen); 1 % (v/v) MEM Non Essential Amino Acids Solution 100X (Invitrogen); and 1.2 % (w/v)
116 filter-sterilized glucose.

117

118 **Three-phase partitioning**

119 Extraction / concentration of the soluble supernatant proteins of *C. pseudotuberculosis* followed the
120 three-phase partitioning (TPP) protocol previously optimized by our group,¹¹ with minor modifications.
121 Briefly, overnight cultures (*ca.* 24 hours) of the different *C. pseudotuberculosis* strains were inoculated
122 (1:100) separately into 500 mL of pre-warmed fresh CDM and incubated at 37°C, with agitation at 100 rpm,
123 until reach the mid-exponential growth phase ($OD_{540nm} = 0.4$; LabSystems iEMS Absorbance Plate Reader).
124 At this point, cultures were centrifuged at room temperature (RT) for 20 min, 4.000 rpm, and 400 mL of each
125 supernatant was transferred into new sterile flaks. Following addition of 20 μ L Protease Inhibitor Cocktail
126 P8465 (Sigma-Aldrich), supernatants were filtered through 0.22 μ m filters; ammonium sulphate was added
127 to the samples at 30 % (w/v) and the pH of the mixtures were set to 4.0. Then, *n*-butanol was added to each
128 sample at an equal volume; samples were vigorously vortexed and left to rest for 1h at RT, until the mixtures
129 separated into three phases. The interfacial precipitate was collected in 1.5 mL microtubes, and re-suspended
130 in 1 mL Tris 20 mM + 10 μ L protease inhibitor. Finally, samples were submitted to diafiltration and buffer
131 exchange with NH_4HCO_3 (100 mM), using 5 kDa cut-off spin columns (Millipore).

132

133 **In-solution tryptic digestion of TPP-extracted proteins**

134 Protein samples were resuspended in 1 mL of 0.1% Rapigest (Waters Corporation, Milford, MA) and
135 concentrated using a 5 kDa cut-off spin column. The solution was heated at 80 °C for 15 minutes, reduced
136 with dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide and digested with 1:50 (w/w) sequencing grade trypsin for
137 16 hours. RapiGest was hydrolysed by the addition of 2 μ L of 13 M trifluoroacetic acid, filtered using a 0.22
138 μ m spin column and each sample was typically diluted to 1 μ g/ μ L prior to a 1:1 dilution with a 100 fmol/ μ L
139 glycogen phosphorylase B standard tryptic digest to give a final protein concentration of 500 ng/ μ L per
140 sample and 50 fmol/ μ L phosphorylase B.

141

LC-MS configurations for label-free analysis (LC-MS^E)

Nanoscale LC separations of tryptic peptides for qualitative and quantitative multiplexed LC-MS analysis were performed with a nanoACQUITY system (Waters Corporation) using a Symmetry C₁₈ trapping column (180 μm x 20 mm 5 μm) and a BEH C₁₈ analytical column (75 μm x 250 mm 1.7 μm). The composition of solvent A was 0.1% formic acid in water, and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). Each sample (total digested protein 0.5 μg) was applied to the trapping column and flushed with 0.1% solvent B for 2 minutes at a flow rate of 15 μL/min. Sample elution was performed at a flow rate of 250 nL/min by increasing the organic solvent concentration from 3 to 40% B over 90 min. All analyses were conducted in a minimum of triplicate. The precursor ion masses and associated fragment ion spectra of the tryptic peptides were mass measured with a Q-ToF Ultima Global or Synapt HDMS mass spectrometer (Waters Corporation) directly coupled to the chromatographic system.

The time-of-flight analyzers of both mass spectrometers were externally calibrated using the MS/MS spectrum from [Glu¹]-Fibrinopeptide B (human - Sigma Aldrich, UK) obtained from the doubly charged peptide ion at m/z 785.8426. The monoisotopic mass of the doubly charged species in MS mode was also used for post-acquisition data correction. The latter was delivered at 500 fmol/μL to the mass spectrometer via a NanoLockSpray interface using the auxiliary pump of a nanoACQUITY system at a flow rate of 500 nL/min, sampled every 60 seconds.

Accurate mass data were collected in data independent mode of acquisition by alternating the energy applied to the collision cell/s between a low and elevated energy state (MS^E). The spectral acquisition scan rate was typically 0.9 s with a 0.1 s interscan delay. On the Synapt HDMS instrument in the low energy MS mode, data were collected at constant trap and transfer collision energies (CE) of 3 eV and 1 eV respectively. In elevated energy MS mode, the trap collision energy was ramped from 15 eV to 30 eV with the transfer collision energy at 10 eV. On the Ultima Global instrument a low energy of 6 eV was applied to the collision cell, increasing from 6 eV to 35 eV in elevated MS mode.

166 **Data processing for label-free acquisitions (MS^E)**

167 The LC-MS^E data were processed using ProteinLynx Global Server v2.4 (Waters Corporation,
168 Milford, MA). In brief, lockmass-corrected spectra are centroided, deisotoped, and charge-state-reduced to
169 produce a single accurately mass measured monoisotopic mass for each peptide and the associated fragment
170 ion. The initial correlation of a precursor and a potential fragment ion is achieved by means of time
171 alignment. The detection and correlation principles for data independent, alternate scanning LC-MS^E data
172 have been described.¹⁴

174 **Database searches**

175 All data were searched using PLGS v2.4 against a *Corynebacterium pseudotuberculosis* database
176 (RGMG - RPGP) to which the glycogen phosphorylase B and trypsin sequences had been appended. The
177 database was randomised within PLGS generating a new concatenated database consisting of the original
178 sequences plus one additional sequence for each entry with identical composition but randomly scrambled
179 residues. A fixed modification of carbamidomethyl-C was specified, and variable modifications included
180 were acetyl N-terminus, deamidation N, deamidation Q and oxidation M. One missed trypsin cleavage site
181 was permitted.

182 For the MS^E data, the time-based correlation applied in data processing is followed by a further
183 correlation process during the database search that is based on the physicochemical properties of peptides
184 when they undergo collision induced fragmentation. The precursor and fragment ion tolerances were
185 determined automatically. The protein identification criteria also included the detection of at least three
186 fragment ions per peptide, at least one peptide determined per protein and the identification of the protein in a
187 minimum of two technical replicates.

189 **Protein quantification using label-free system (MS^E)**

190 Relative quantitative analysis between samples was performed by comparing normalized peak
191 area/intensity of each identified peptide.²⁸ For relative quantification, automatic normalization was applied to
192 the data set within PLGS using the total peptide complement of each sample. The entire data set of
193 differentially expressed proteins was further filtered by considering only the identified proteins that
194 replicated in at least two technical replicates with a score > 250 and likelihood of regulation value greater
195 than 0.95 for upregulation and lower than 0.05 for downregulation as determined by the PLGS quantification
196 algorithm.

198 ***In silico* predictions of protein sub-cellular localization**

199 Prediction of sub-cellular localization was performed initially for the identified proteins by using the
200 SurfG+ program v1.0, run locally in a Linux environment, as described.¹⁵ For prediction of potentially
201 surface exposed (PSE) proteins, a cut-off value of 73 amino acids was calculated as the minimum distance
202 from the *C. pseudotuberculosis* outermost membrane until the surface of the cell-wall, based on electron
203 microscopy of this bacterium's cell envelope (data not shown).

204 The programs TatP v1.0 and SecretomeP v2.0 were used through the web applications available at
205 <http://www.cbs.dtu.dk/services/>, for prediction of twin-arginine pathway-linked signal peptides and non-
206 classical (leaderless) secretion, respectively.^{29,30}

208 **Comparative analyses of multiple corynebacterial exoproteomes**

209 A list of experimentally observed extracellular proteins of pathogenic (*C. diphtheriae* and *C.*
210 *jeikeium*) and non-pathogenic (*C. glutamicum* and *C. efficiens*) corynebacteria was identified in previously
211 published studies.^{17, 31-33} The amino acid sequences of these proteins were retrieved from public repositories

212 of protein sequences to create a local database. This database was used in similarity searches with the Blast-p
213 algorithm (E-value < 10^{-4}),³⁴ taking the group or proteins identified in the *C. pseudotuberculosis*
214 exoproteome as the input sequences. The amino acid sequences of the identified *C. pseudotuberculosis*
215 exoproteins were also used in similarity searches against public databases, namely NCBI nr and Swissprot.

217 **Results and Discussion**

218 **Exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis***

219 The extracellular proteins of two *C. pseudotuberculosis* strains, one isolated from a goat (strain 1002)
220 the other from a sheep (strain C231), cultivated in a chemically-defined medium, were extracted /
221 concentrated by the three-phase partitioning (TPP) technique. The trypsinized protein samples were then
222 submitted to LC-MS^E analysis. This experimental approach combined a protocol previously optimized by our
223 group to efficiently extract immunoreactive extracellular proteins of *C. pseudotuberculosis*¹¹ with a recently
224 described method of data independent LC-MS acquisition (LC-MS^E) that allows for simultaneous
225 identification and label-free quantification of proteins in complex mixtures.^{13, 14}

226 Seventy soluble extracellular proteins of the 1002 strain could be confidentially identified by this
227 methodology, whereas the number of proteins identified in the exoproteome of the C231 strain was sixty-
228 seven. Altogether, 93 different *C. pseudotuberculosis* exoproteins were identified in this study (see Figure 1).
229 These findings agree with the results of previous experiments by our group, in which we have used a 2D-
230 PAGE based strategy for a preliminary appraisal of the *C. pseudotuberculosis* exoproteome (Supplementary
231 Figure 1). Eighty protein spots, mostly concentrated in the pI range between 3.0 and 6.0, could be
232 reproducibly identified in the 2D gels generated from TPP-extracted extracellular proteins of the 1002 strain
233 (Supplementary Figure 1a). The spots were excised from gels, treated and submitted to matrix-assisted laser
234 desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS) for protein
235 identification, according to standard protocols. However, not many confident protein identifications were

236 obtained using this methodology (Supplementary Table 1). The fact that we have found 70 proteins in the
237 exoproteome of the 1002 strain with high confidence when using the LC-MS^E method (see Figure 1)
238 indicates that this novel methodology allowed us to identify virtually the complete set of extracellular
239 proteins that are commonly observed for this strain of *C. pseudotuberculosis* in the gel based methodologies
240 (Supplementary Figure 1b). Moreover, the expected existence of protein isoforms among the eighty protein
241 spots observed in the 2D gels, and the identification by LC-MS^E of many proteins out of the pI range 3.0-6.0,
242 suggests that the latter methodology is much more suitable for obtaining a comprehensive coverage of the
243 bacterial exoproteome. Noteworthy, is the use of LC-MS^E for exoproteome profiling which required (i) much
244 less time and labor than the gel based proteomic strategy, and (ii) much less protein sample necessary for
245 each experimental replicate, with only 0.5 µg used in the LC-MS^E compared to 150 µg for the 2D gels [refer
246 to Patel et al.³⁵ for a comprehensive comparison on these proteomic strategies].

247 The performance of the combined methodology used in the present study (TPP/LC-MS^E) for mapping
248 the *C. pseudotuberculosis* exoproteome was very similar for both strains analyzed, as can be seen by the
249 average numbers of peptides observed per protein in the two proteomes (16.5 and 15.0) and by the average
250 sequence coverage of the proteins identified (37.5 % and 35.0 %) (see Figure 1). Consistent with this, the
251 majority of the proteins detected in each extracellular proteome were shared by the goat and sheep isolates;
252 this permitted us to define a core *C. pseudotuberculosis* exoproteome composed of 44 proteins out of the 93
253 different extracellular proteins identified (see Table 1).

254 Searches of similarity against publicly available protein databases using the Blast-p tool³⁴ showed that
255 ortholog proteins can be found in the pathogenic *Corynebacterium diphtheriae* for most of the identified *C.*
256 *pseudotuberculosis* exoproteins (see Tables 1, 2 and 3), as would be expected due to the close phylogenetic
257 relationship of these species.³⁶ Nevertheless, no significant orthologs could be found for two proteins of the
258 *C. pseudotuberculosis* exoproteome, even when using the position-specific iterated BLAST (PSI-BLAST)
259 algorithm³⁷, namely the hypothetical proteins Cp1002_0130 and Cp1002_1140 (see Tables 1 and 2). The

260 former protein was considered by two different prediction tools as being a truly secreted protein, making it
261 the only protein identified in this study that is apparently uniquely secreted by *C. pseudotuberculosis*.

263 **Prediction of sub-cellular localization of the identified proteins**

264 Most of the proteins identified in the exoproteomes of the two *C. pseudotuberculosis* strains were also
265 predicted to have a probable extracytoplasmic localization after *in silico* analysis of these protein's sequences
266 with different bioinformatics tools, thereby corroborating our *in vitro* findings (see Figure 2 and
267 Supplementary Figure 2). It is important to note here that we are considering the exoproteome as the entire
268 set of proteins released by the bacteria into the extracellular milieu. That means we are looking to: (i)
269 proteins possessing classical signals for active exportation by the different known mechanisms, which are
270 directly secreted into the cell supernatant or that remain exposed in the bacterial cell surface and are
271 eventually released in the growth medium;⁷ and (ii) proteins exported by non-classical pathways, without
272 recognizable signal peptides.³⁰ Besides, one might also expect to observe in the extracellular proteome a
273 small number of proteins primarily known to have cytoplasmic localization; although some of these proteins
274 are believed to be originated from cell lysis or leakage, like in the extreme situation reported by
275 Mastronunzio et al.¹⁹, a growing body of evidence suggests that moonlighting proteins (in this case,
276 cytoplasmic proteins that assume diverse functions in the extracellular space) may be commonly found in the
277 bacterial exoproteomes.^{30, 38-40}

278 By using the recently developed tool SurfG+ we were able to classify the identified *C.*
279 *pseudotuberculosis* proteins into four different categories: (i) secreted, (ii) potentially surface exposed (PSE),
280 (iii) membrane and (iv) cytoplasmic (see Figure 2; Tables 1, 2 and 3). Basically, this software brings together
281 the predictions of global protein localizations performed by a series of well-known algorithms, and innovates
282 by allowing for an accurate prediction of PSE proteins.¹⁵ This possibility of classification provides us with
283 valuable information on the proteins identified, as bacterial surface exposed proteins are believed to play

284 important roles in the host-pathogen interactions during infection and many of these proteins have been
285 shown to be highly protective when used in vaccine preparations.^{41, 42}

286 From a total of 93 different *C. pseudotuberculosis* proteins identified in this study, 75 % (70) could
287 be predicted as containing signals for active exportation (secretion or surface exposition) following SurfG+
288 analysis (see Figure 2). This concordance of our *in vitro* identification of exoproteins with the *in silico*
289 predictions of protein exportation is higher than what has normally been observed in recent exoproteome
290 analyses of different bacteria.^{17-19, 43, 44} For comparison, Hansmeier et al.¹⁷ reported that exportation signals
291 could be predicted in only 42 (50 %) out of 85 different proteins identified in the extracellular and cell
292 surface proteomes of *Corynebacterium diphtheriae*. The authors of this study are not the only to speculate on
293 a probably important contribution of cross-contamination of the protein sample during preparation
294 procedures for the observation of high numbers of proteins not predicted as having extracellular location in
295 the bacterial exoproteomes.^{17, 39} We believe that the proportionally higher identification of proteins
296 possessing exportation signals in the present study could have happened due to a series of different factors,
297 including: (i) our methodology for isolation of the bacterial extracellular proteins might have extracted less
298 “contaminant” cytoplasmic proteins than did other methodologies reported in previous studies; (ii) the
299 combined strategy used by SurfG+ to predict protein sub-cellular localization might have performed better in
300 the identification of exported proteins than happened with other strategies, sometimes based in only one
301 prediction tool; (iii) the fact that we have included in the final exoproteome lists only proteins identified with
302 high confidence, in at least two experimental replicates, reduced significantly the possibilities of false-
303 positive identifications that might account for some of the unexpected proteins; and finally (iv) the lower
304 proportion of proteins primarily regarded as cytoplasmic might be actually a typical characteristic of the *C.*
305 *pseudotuberculosis* exoproteome. A comprehensive comparison of the methods described in the present
306 study for characterization of the bacterial exoproteome with the methodologies described in previous studies
307 remains necessary to identify which of the aforementioned possibilities will hold true.

308 **Non-classically secreted proteins**

309 Intriguingly, a much higher proportion (29.0 %) of the exoproteome of the 1002 strain of *C.*
310 *pseudotuberculosis* was composed by proteins predicted by SurfG+ as not having an extracytoplasmic
311 location, when compared to only 4.5 % in the exoproteome of the strain C231 (see Figure 2). In order to
312 evaluate the possibility of these proteins to be non-classically secreted, we have performed a further analysis
313 of the protein's sequences using the SecretomeP method.³⁰ Besides, we have searched the literature for
314 evidences in other bacterial exoproteomes that could support the extracellular localization found for these
315 proteins in this study.

316 High SecP scores (above 0.5) could be predicted for 5 of the 19 proteins in the exoproteome of the
317 1002 strain considered by SurfG+ as having a cytoplasmic location (see Tables 1 and 2); this could be an
318 indicative that they are actually being secreted by non-classical mechanisms.³⁰ Nonetheless, 2 of these 5
319 proteins (Cp1002_0130 and Cp1002_0883) were also detected in the exoproteome of the C231 strain, in
320 which they were predicted by SurfG+ as possessing an extracytoplasmic location (see Table 1). A
321 comparative analysis of the sequences encoding these proteins in the genomes of the two *C.*
322 *pseudotuberculosis* strains showed that the disparate results were generated due to the existence of nonsense
323 mutations in the genome sequence of the 1002 strain, which impaired the identification of signal peptides for
324 the two proteins at the time of SurfG+ analysis (data not shown). We believe that it is unlikely that these
325 differences represent true polymorphisms, as the proteins were identified in the extracellular proteome,
326 indicating the real existence of exportation signals. This indeed demonstrates the obvious vulnerability of the
327 prediction tools to the proper annotation of the bacterial genomes. On the other hand, the assignment of high
328 SecP scores to these two proteins, even though they are not believed to be secreted by non-classical
329 mechanisms, would be totally expected, as the SecretomeP is a predictor based on a neural network trained to
330 identify general features of extracellular proteins; this means the prediction tool will attribute SecP scores
331 higher than 0.5 to most of the secreted proteins, regardless the route of export.³⁰

332 We have found reports in the literature that strongly support the extracellular localization observed
333 for 8 of the 14 remaining proteins considered as non-secretory by SurfG+ and SecretomeP in the
334 exoproteome of the 1002 strain, and without any detectable signal peptide (see Tables 1 and 2; Figure 2).
335 Among these proteins are the elongation factors Tu and Ts;^{16,31,41,43,45,46} the glycolytic enzymes
336 triosephosphate isomerase, phosphoglycerate kinase and phosphoglycerate mutase;^{16-20,31, 45-47} the chaperonin
337 GroES;^{16-18,20, 46} a putative peptidyl prolyl cis trans isomerase;^{17,18,31,43,48} and a hydroperoxide reductase
338 enzyme^{17,43,46}.

339 Proteins primarily regarded as cytoplasmic have consistently been identified in the exoproteomes of
340 different bacterial species, and moonlighting roles in the extracellular environment have already been
341 demonstrated for some of them,^{39, 40} including evasion of host's immune system,⁴⁹ adhesion to host cells,^{50, 51}
342 folding of extracytoplasmic proteins,^{48, 52} and interaction between microorganisms.^{47, 53} Noteworthy, specific
343 evidences for active secretion of such cytoplasmic proteins have been demonstrated for only a few examples
344 to date, and demonstration of an extracellular function is still missing for many of these proteins.^{38, 39}

345 Other proteins identified in the present study and classified as cytoplasmic (see Figure 2; Tables 1, 2
346 and 3) include a putative exported esterase / hydrolase (Cp1002_0637) and a FHA domain-containing protein
347 (Cp1002_1958). No exportation signal was predicted in the former protein, and analysis with SecretomeP
348 rendered a low score (SecP = 0.22); however, its main ortholog, a putative exported esterase (DIP1116) from
349 *C. diphtheriae*, possesses a probable Sec-type signal peptide, and experimental evidence for extracellular
350 location could be found in the literature for at least one other ortholog protein.⁵⁴ The Cp1002_1958 in turn, is
351 a probable oxoglutarate dehydrogenase inhibitor (OdhI) protein highly conserved in corynebacteria and
352 mycobacteria;⁵⁵ the ortholog protein GarA of *Mycobacterium tuberculosis* has already been detected in the
353 cell filtrate fraction, in which it was seen to be phosphorylated by protein kinases, but a function for this
354 protein in the extracellular environment remains to be elucidated.^{56, 57} Ultimately, the proteins Cp1002_1958
355 and Cp1002_0637 were kept classified as cytoplasmic, since they were not predicted as secretory and did not
356 fulfill the conditions for classification as non-classically secreted, *i.e.* either high SecP score or extensive

357 experimental evidences of exportation in the literature; it seems not to be unexpected to find these proteins in
358 the extracellular proteome though.

359 Altogether, the analyses indicate that the great majority of the proteins primarily predicted as
360 cytoplasmic in the exoproteome of the 1002 strain of *C. pseudotuberculosis* could therefore be expected to
361 have an extracellular location. The reasons why the C231 strain presented much less proteins likely to be
362 exported by non-classical mechanisms remains a matter for investigation.

363

364 **The variant exoproteome may account for differential virulence of the two *C. pseudotuberculosis***

365 **strains**

366 A considerable number (49/93) of the extracellular proteins identified in this work was observed in
367 only one of the two strains studied, then composing a variant experimental *C. pseudotuberculosis*
368 exoproteome (see Tables 2 and 3). Highly variant exoproteomes have also been reported recently for other
369 Gram+ bacterial pathogens,^{20, 44, 46, 58-60} and such variation may be considered as an important factor leading
370 to the observable phenotypic dissimilarities and ultimately to differential virulence of the various strains.^{61, 62}
371 Hecker et al.⁴⁴ reported on how the composition of the exoproteome can vary extremely within a single
372 species, *Staphylococcus aureus*, being that only 7 out of 63 identified extracellular proteins were found in all
373 the twenty-five clinical isolates studied.

374 One of the most intriguing results in the present study was the detection of the phospholipase D
375 (PLD) protein only in the extracellular proteome of the strain C231 (see Table 3). As the regulation of PLD
376 expression was demonstrated to be complex and highly affected by multiple environmental factors,⁶³ we
377 sought to detect this protein in the culture supernatant of the *C. pseudotuberculosis* 1002 strain grown in a
378 rich medium (brain-heart infusion broth) instead of only chemically-defined medium (CDM), but these
379 attempts were also unfruitful (Supplementary Table 2). Besides, we were not able to detect secretion of PLD
380 following total exoproteome analysis of the 1002 strain grown under specific stress generating conditions

381 (Pacheco et al., unpublished). The results strongly indicate that this protein is actually not being secreted by
382 the 1002 strain in culture.

383 PLD is an exotoxin considered as the major virulence factor of *C. pseudotuberculosis*.^{5, 63} It possesses
384 sphingomyelinase activity that contributes to endothelial permeability and then to spreading of the bacteria
385 within the host.⁵ Mutation of the *pld* gene in *C. pseudotuberculosis* rendered strains no longer capable of
386 causing caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats; the potential of these strains to be used as live
387 attenuated vaccines was already evaluated.⁶⁴⁻⁶⁶ Similarly, the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis* was
388 already tested as a possible live attenuated vaccine against CLA due to its natural low virulent status, and
389 administration of this bacterium to goats did not cause lesions formation;^{23, 25} however, the molecular
390 mechanisms leading to the low virulence of the 1002 strain remain undetermined so far. We believe that non-
391 secretion of PLD might be one of the main factors responsible for the lowered virulence of the strain; then,
392 we have compared the regions upstream the *pld* gene in the genome sequences of the two *C.*
393 *pseudotuberculosis* strains seeking for differences that might help to explain the disparities observed in PLD
394 expression. Interestingly, a transversion mutation (from T to G) was found in the 1002 strain, in a region
395 predicted to be the -35 element of a probable *pld* promoter (Supplementary Figure 3). Similar mutations were
396 shown by Song et al.⁶⁷ to have a drastic effect on mycobacterial promoter recognition and transcription.
397 Whether this single mutation identified in this study could account for very low, or even absent, expression
398 of PLD by the 1002 strain of *C. pseudotuberculosis*, remains to be investigated in details.

399 Importantly, we currently can not affirm that the 1002 strain does not produce PLD while infecting a
400 mammalian host. Besides, this strain still retains the capability of causing localized abscesses and disease in
401 susceptible mice (Pacheco et al., unpublished results).

402 Other proteins believed to be associated with the virulence of *C. pseudotuberculosis* were also
403 identified exclusively in the exoproteome of the C231 strain, namely FagD and Cp40 (see Table 4). The
404 former protein is a component of an iron uptake system, whose coding sequences are clustered immediately

405 downstream of the *pld* gene in the *C. pseudotuberculosis* genome.⁶ The latter protein is a secreted serine
406 protease shown to be protective against CLA when used to vaccinate sheep.⁶⁸

407 Strikingly, one variant protein of the *C. pseudotuberculosis* exoproteome, a conserved hypothetical
408 exported protein with a cutinase domain (CpC231.0678), has its coding sequence present in the genome of
409 the C231 strain but absent from the genome of the 1002 strain (Supplementary Figure 4). The genomic
410 structure of the gene's surroundings is indicative of a region prone to recombination events, such as
411 horizontal gene transfer (Supplementary Figure 4).⁶⁹ In fact, it seems that gene gain and loss are frequent
412 events leading to variations observed in the bacterial exoproteomes.^{46, 70}

413 Exoproteome profiling of additional *C. pseudotuberculosis* strains will be valuable to better define the
414 contribution of the variant extracellular proteins to differential virulence.

415

416 **Variation of the core exoproteome: differential expression analysis of the common proteins by LC-** 417 **MS^E**

418 In addition to identifying qualitative variations in the exoproteomes of the two *C. pseudotuberculosis*
419 strains, we were also able to detect relative differences in expression of the proteins common to the two
420 proteomes through label-free protein quantification by the LC-MS^E method. Relative protein quantification
421 by this method can be obtained with basis on the accurate precursor ion mass and electrospray intensity data,
422 acquired during the low energy scan step of the alternating scan mode of MS acquisition.¹⁴ Importantly, this
423 quantitative attribute of the technique opens up new possibilities of utilization, as grows the interest on the
424 so-called physiological proteomics.²¹

425 Thirty-four out of 44 proteins commonly identified in the exoproteomes of the strains 1002 and C231
426 of *C. pseudotuberculosis* were considered by the PLGS quantification algorithm as having significantly
427 variable expression (score > 250; 95 % CI) (see Table 1 and Figure 3). If we further filter these results for the

428 proteins presenting differential expression higher than 2-fold between the strains, we end up with only four
429 proteins up-regulated in the 1002 strain and sixteen in the C231 strain (see Figure 3).

430 Among the group of proteins not presenting considerable variations in expression between the two *C.*
431 *pseudotuberculosis* strains, proteins probably participating in basic bacterial physiological processes could be
432 easily identified, as would be expected, including cell shape maintenance and cell division (penicillin binding
433 protein, transglycosylases, peptidases, PGRP amidase);⁷¹ and iron uptake and utilization (HmuT)⁷² (see Table
434 1 and Figure 3). In this sense, one might also speculate that the hypothetical proteins identified as non variant
435 in the two strains may have functions associated to the general physiology of *C. pseudotuberculosis*, when
436 grown in minimal medium.

437 The most up-regulated proteins were observed in the extracellular proteome of the C231 strain,
438 including two cell envelope-associated proteins,⁷³ namely the major secreted (mycoloyltransferase) protein
439 PS1 (10-fold up-regulated), and the S-layer protein A (8-fold up-regulation) (see Firure 3). This may be
440 indicative of differences on cell envelope-related activities in the two *C. pseudotuberculosis* strains, such as
441 nutrient acquisition, protein export, adherence and interaction with the host.⁷⁴ Dumas et al.⁶⁰ compared the
442 exoproteomes of *Listeria monocytogenes* strains of different virulence groups, and found that altered
443 expression (up- or down-regulation) of a protein related to the bacterial cell wall could be a marker of
444 specific virulence phenotypes. Additionally, surface associated proteins have been shown to undergo phase
445 and antigenic variation in some bacterial pathogens, and ultimately affect the infectivity potential of different
446 strains.⁶¹

447

448 **Comparative analyses of corynebacterial exoproteomes**

449 Recent studies attempted to characterize the extracellular proteomes of other pathogenic (*C.*
450 *diphtheriae* and *C. jeikeium*) and non-pathogenic (*C. glutamicum* and *C. efficiens*) corynebacterial species.^{17,}

451 ³¹⁻³³ All these studies used 2D-PAGE to resolve the extracellular proteins of the different corynebacteria, and

452 PMF by MALDI-TOF-MS was the method of choice in most of them for protein identification.^{17, 31-33} Figure
453 4a shows the numbers of proteins identified in the exoproteomes of all strains studied, in comparison to the
454 numbers obtained in the present study for *C. pseudotuberculosis*. Despite one study with the strain R of *C.*
455 *glutamicum*, which reports identification of only two secreted proteins,³³ all the corynebacterial strains had
456 somehow similar numbers of extracellular proteins identified, ranging from forty-seven in *C. jeikeium* K411
457 to seventy-four in *C. diphtheriae* C7s(-)^{tox-}. Importantly, the fact that we have identified in this study 93
458 different exoproteins of *C. pseudotuberculosis*, through the analysis of two different strains, means that our
459 dataset represents the most comprehensive exoproteome analysis of a corynebacterial species so far.

460 Regardless the different methodologies employed to characterize the exoproteomes of the various
461 corynebacteria, we sought to identify extracellular proteins commonly identified in most of the studies,
462 taking the catalogue of *C. pseudotuberculosis* exoproteins generated in this work as the comparison dataset.
463 Besides corroborating our findings, the objective here was to identify extracellular proteins that could be
464 associated exclusively to pathogenic corynebacterial species.

465 In total, 34 proteins identified in the exoproteome of the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis* were
466 found to be present in the experimentally determined extracellular proteomes of other corynebacteria,
467 whereas the number of common corynebacterial exoproteins in the C231 strain was 32 (Figure 4b). Only 5
468 proteins were consistently identified in all the corynebacterial exoproteomes, including pathogenic and non-
469 pathogenic species: (i) S-layer protein A;⁷³ (ii) resuscitation-promoting factor RpfB;⁷⁵ (iii) cytochrome c
470 oxidase subunit II;⁷⁶ (iv) a putative esterase; and (v) a NLP / P60 family protein (putative cell wall-associated
471 hydrolase)⁷⁷ (Figure 4b).

472 Eleven proteins of the exoproteome of the 1002 strain and fourteen of the C231 strain were also
473 detected experimentally only in the exoproteomes of other pathogenic corynebacteria, namely *C. diphtheriae*
474 and *C. jeikeium* (Figure 4b). Altogether, this represents 18 different *C. pseudotuberculosis* proteins. A search
475 of similarity using the sequences of these proteins against publicly available databases, believed to contain

476 the predicted proteomes of all corynebacteria with completely sequenced genomes, showed that 6 of these 18
477 proteins are apparently absent from non-pathogenic corynebacterial species (see Table 4). Among them, two
478 proteins presented orthologs highly distributed in various bacterial pathogens: (i) a putative iron transport
479 system binding (secreted) protein (CpC231.2070); and (ii) a putative glycerophosphoryl diester
480 phosphodiesterase (CpC231.1033). Interestingly, an ortholog of this latter protein was included recently in a
481 list of seventeen proteins found to be very common in pathogenic bacteria and absent or very uncommon in
482 non-pathogens, representing then probable virulence-associated factors.⁷⁸ In fact, reports in the literature can
483 be found that associate orthologs of the two aforementioned proteins with virulence phenotypes.^{79, 80}
484 Noteworthy, both proteins were detected in this study only in the exoproteome of the C231 strain of *C.*
485 *pseudotuberculosis*, the more virulent one.

487 **Conclusions**

488 There seems to be a growing interest in profiling the exoproteomes of bacterial pathogens, due to the
489 distinguished roles played by exported proteins on host-pathogen interactions.¹⁰ Classical proteomic profiling
490 strategies, normally involving two-dimensional (2D) gel electrophoresis, have been extensively used for this
491 purpose.¹⁶⁻²⁰ Nevertheless, the introduction of more high-throughput proteomic technologies brings new
492 perspectives to the study of bacterial exoproteomes, as it makes it easier to analyze multiple phenotypically
493 distinct strains, yielding better subproteome coverage with fewer concerns regarding technical sensitivity and
494 reproducibility.⁸¹ Besides, the currently available methods for label-free quantification of proteins⁸² allow us
495 to compare the “dynamic behavior” of the exoproteome across different bacterial strains, and this in turn will
496 help us to better identify alterations of the exoproteome that may contribute to the various virulence
497 phenotypes.

498 By using a high-throughput proteomic strategy, based on a recently introduced method of LC-MS
499 acquisition (LC-MS^E),¹⁴ we were able to perform a very comprehensive analysis of the exoproteome of an

500 important veterinary pathogen, *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Comparative exoproteome analysis of
501 two strains presenting different virulence status allowed us to detect considerable variations of the core *C.*
502 *pseudotuberculosis* extracellular proteome, and thereby increased significantly the number of exoproteins
503 identified. Most importantly, it helped us in gaining new insights into the probable participation of *C.*
504 *pseudotuberculosis* exported proteins, other than the well-known PLD and FagB, in the virulence of this
505 bacterium. Several novel targets for future work on *C. pseudotuberculosis* molecular determinants of
506 virulence can be identified from the catalogue of exoproteins generated in this study. Interestingly, around 30
507 % of the proteins identified were predicted by the SurfG+ software¹⁵ as being probably surface exposed in *C.*
508 *pseudotuberculosis*. Such proteins may represent promising new candidates for composing a CLA vaccine
509 more effective than the ones currently available,⁴ as has been demonstrated for a series of other bacterial
510 pathogens.^{41, 42} Therefore, it will be critical to further study the role of this protein set in virulence and
511 vaccine design.

513 **Acknowledgment**

514 We are thankful to the Minas Gerais Genome Network (RGMG) and to the Genome and Proteome Network
515 of the State of Pará (RPGP). We thank Dr. Robert Moore for providing the C231 strain of *C.*
516 *pseudotuberculosis*.

517 This work was supported by grants from the Funding Agencies CNPq (grant CNPq/MAPA/SDA) and
518 FAPEMIG, in Brazil; and by The Medical Research Fund and Advantage West Midlands, in the UK.

519 **Supporting Information Available**

521 **References**

- 522 (1) Dorella, F. A.; Pacheco, L. G. C.; Oliveira, S. C.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. *Corynebacterium*
523 *pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.
524 *Vet. Res.* **2006**, 37, 201-218.
- 525 (2) Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.; Fitzgerald, G. F.; Chater, K. F.; van Sinderen,
526 D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol.*
527 *Rev.* **2007**, 71, 495-548.
- 528 (3) Baird, G. J.; Fontaine, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous
529 lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* **2007**, 137, 179-210.
- 530 (4) Dorella, F. A.; Pacheco, L. G.; Seyffert, N.; Portela, R. W.; Meyer, R.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.
531 Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev*
532 *Vaccines* **2009**, 8, 205-213.
- 533 (5) Hodgson, A. L.; Bird, P.; Nisbet, I. T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia*
534 *coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 1256-
535 1261.
- 536 (6) Billington, S. J.; Esmay, P. A.; Songer, J. G.; Jost, B. H. Identification and role in virulence of
537 putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 208,
538 41-45.
- 539 (7) Desvaux, M.; Hébraud, M.; Talon, R.; Henderson, I. R. Secretion and subcellular localizations of
540 bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* **2009**, 17, 139-145.
- 541 (8) Bhavsar, A. P.; Guttman, J. A.; Finlay, B. B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial
542 pathogens. *Nature* **2007**, 449, 827-834.
- 543 (9) Stavrinides, J.; McCann, H. C.; Guttman, D. S. Host-pathogen interplay and the evolution of
544 bacterial effectors. *Cell. Microbiol.* **2008**, 10, 285-292.
- 545 (10) Sibbald, M.J.J.B, and van Dij J. M.I. Secretome Mapping in Gram-Positive Pathogens. In *Bacterial*
546 *secreted protein: secretory mechanisms and role in pathogenesis*. Karl Wooldridge . Caister Academic
547 Press:**2009**. pp 193-225.
- 548 (11) Paule, B. J. A.; Meyer, R.; Moura-Costa, L. F.; Bahia, R. C.; Carminati, R.; Regis, L. F.; Vale, V. L.
549 C.; Freire, S. M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Azevedo, V. Three-phase partitioning as an efficient method for
550 extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium*
551 *pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* **2004**, 34, 311-316.
- 552 (12) Dorella, F. A.; Estevam, E. M.; Pacheco, L. G. C.; Guimarães, C. T.; Lana, U. G. P.; Gomes, E. A.;
553 Barsante, M. M.; Oliveira, S. C.; Meyer, R.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. In vivo insertional mutagenesis in
554 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported
555 proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 7368-7372.

- 556 (13) Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G.; Vissers, J. P. C.; Geromanos, S. J. Absolute quantification of
557 proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell Proteomics* **2006**, *5*, 144-156.
- 558 (14) Geromanos, S. J.; Vissers, J. P. C.; Silva, J. C.; Dorschel, C. A.; Li, G.; Gorenstein, M. V.; Bateman,
559 R. H.; Langridge, J. I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from
560 data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **2009**, *9*, 1683-1695.
- 561 (15) Barinov, A.; Loux, V.; Hammani, A.; Nicolas, P.; Langella, P.; Ehrlich, D.; Maguin, E.; van de
562 Guchte, M. Prediction of surface exposed proteins in Streptococcus pyogenes, with a potential application to
563 other Gram-positive bacteria. *Proteomics* **2009**, *9*, 61-73.
- 564 (16) Trost, M.; Wehmhöner, D.; Kärst, U.; Dieterich, G.; Wehland, J.; Jansch, L. Comparative proteome
565 analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species. *Proteomics* **2005**, *5*,
566 1544-1557.
- 567 (17) Hansmeier, N.; Chao, T.; Kalinowski, J.; Pühler, A.; Tauch, A. Mapping and comprehensive analysis
568 of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen Corynebacterium diphtheriae.
569 *Proteomics* **2006**, *6*, 2465-2476.
- 570 (18) Målen, H.; Berven, F. S.; Fladmark, K. E.; Wiker, H. G. Comprehensive analysis of exported
571 proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics* **2007**, *7*, 1702-1718.
- 572 (19) Mastronunzio, J. E.; Huang, Y.; Benson, D. R. Diminished exoproteome of Frankia spp. in culture
573 and symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6721-6728.
- 574 (20) Dumas, E.; Desvaux, M.; Chambon, C.; Hébraud, M. Insight into the core and variant exoproteomes
575 of Listeria monocytogenes species by comparative subproteomic analysis. *Proteomics* **2009**, *9*, 3136-3155.
- 576 (21) Hecker, M.; Reder, A.; Fuchs, S.; Pagels, M.; Engelmann, S. Physiological proteomics and
577 stress/starvation responses in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 245-
578 258.
- 579 (22) Becher, D.; Hempel, K.; Sievers, S.; Zühlke, D.; Pané-Farré, J.; Otto, A.; Fuchs, S.; Albrecht, D.;
580 Bernhardt, J.; Engelmann, S.; Völker, U.; van Dijl, J. M.; Hecker, M. A proteomic view of an important
581 human pathogen--towards the quantification of the entire Staphylococcus aureus proteome. *PLoS One* **2009**,
582 *4*, e8176.
- 583 (23) Ribeiro, OC, Silva, JAH, Oliveira, SC, Meyer, R, Fernandes, GB Preliminary results on a living
584 vaccine against caseous lymphadenitis. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **1991**, *26*, 461-465.
- 585 (24) Simmons, C. P.; Dunstan, S. J.; Tachedjian, M.; Krywult, J.; Hodgson, A. L.; Strugnell, R. A.
586 Vaccine potential of attenuated mutants of Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep. *Infect. Immun.*
587 **1998**, *66*, 474-479.
- 588 (25) Meyer, R.; Carminati, R.; Bahia, R.; Vale, V.; Viegas, S.; Martinez, T.; Nascimento, I.; Schaer, R.;
589 Silva, J.; Ribeiro, M.; Regis, L.; Paule, B.; Freire, S. Evaluation of the goats humoral immune response
590 induced by the Corynebacterium pseudotuberculosis lyophilized live vaccine.. *J. Med. Biol. Sci.* **2002**, *1*, 42-
591 48.

- 592 (26) Pacheco, L. G. C.; Pena, R. R.; Castro, T. L. P.; Dorella, F. A.; Bahia, R. C.; Carminati, R.; Frota, M.
593 N. L.; Oliveira, S. C.; Meyer, R.; Alves, F. S. F.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. Multiplex PCR assay for
594 identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this
595 pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **2007**, 56, 480-486.
- 596 (27) Moura-Costa L. F.; Paule B. J. A.; Azevedo, V.; Freire S. M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Regis, L.
597 F.; Vale, V. L. C.; Matos, D. P.; Bahia, R. C.; Carminati, R.; Meyer, R. Chemically defined synthetic
598 medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture. *Rev. Bras. Saúde e Produção Animal* **2002**, 3, 1-9.
- 599 (28) Silva, J. C.; Denny, R.; Dorschel, C. A.; Gorenstein, M.; Kass, I. J.; Li, G.; McKenna, T.; Nold, M.
600 J.; Richardson, K.; Young, P.; Geromanos, S. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention
601 time pairs. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2187-2200.
- 602 (29) Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Widdick, D.; Palmer, T.; Brunak, S. Prediction of twin-arginine signal
603 peptides. *BMC Bioinformatics* **2005**, 6, 167.
- 604 (30) Bendtsen, J. D.; Kiemer, L.; Fausbøll, A.; Brunak, S. Non-classical protein secretion in bacteria.
605 *BMC Microbiol.* **2005**, 5, 58.
- 606 (31) Hansmeier, N.; Chao, T.; Pühler, A.; Tauch, A.; Kalinowski, J. The cytosolic, cell surface and
607 extracellular proteomes of the biotechnologically important soil bacterium *Corynebacterium efficiens* YS-
608 314 in comparison to those of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Proteomics* **2006**, 6, 233-250.
- 609 (32) Hansmeier, N.; Chao, T.; Daschkey, S.; Müsken, M.; Kalinowski, J.; Pühler, A.; Tauch, A. A
610 comprehensive proteome map of the lipid-requiring nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411.
611 *Proteomics* **2007**, 7, 1076-1096.
- 612 (33) Suzuki, N.; Watanabe, K.; Okibe, N.; Tsuchida, Y.; Inui, M.; Yukawa, H. Identification of new
613 secreted proteins and secretion of heterologous amylase by *C. glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
614 **2009**, 82, 491-500.
- 615 (34) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool.
616 *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, 403-410.
- 617 (35) Patel, V. J.; Thalassinou, K.; Slade, S. E.; Connolly, J. B.; Crombie, A.; Murrell, J. C.; Scrivens, J. H.
618 A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J. Proteome Res.*
619 **2009**, 8, 3752-3759.
- 620 (36) Khamis, A.; Raoult, D.; La Scola, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium*
621 species. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, 42, 3925-3931.
- 622 (37) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.
623 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*
624 **1997**, 25, 3389-3402.
- 625 (38) Vanet, A.; Labigne, A. Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some
626 *Helicobacter pylori* proteins. *Infect. Immun.* **1998**, 66, 1023-1027.

- 627 (39) Bendtsen, JD, and Wooldridge, KG. Non-Classical Secretion. In *Bacterial secreted proteins:*
628 *secretory mechanisms and role in pathogenesis*. Karl Wooldridge. Caister Academic Press:2009. pp 225-
629 239.
- 630 (40) Jeffery, C. J Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* **2009**, 5, 345-350.
- 631 (41) Rodríguez-Ortega, M. J.; Norais, N.; Bensi, G.; Liberatori, S.; Capo, S.; Mora, M.; Scarselli, M.;
632 Doro, F.; Ferrari, G.; Garaguso, I.; Maggi, T.; Neumann, A.; Covre, A.; Telford, J. L.; Grandi, G.
633 Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A
634 Streptococcus surface proteome. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 191-197.
- 635 (42) Doro, F.; Liberatori, S.; Rodríguez-Ortega, M. J.; Rinaudo, C. D.; Rosini, R.; Mora, M.; Scarselli,
636 M.; Altindis, E.; D'Aurizio, R.; Stella, M.; Margarit, I.; Maione, D.; Telford, J. L.; Norais, N.; Grandi, G.
637 Surfome analysis as a fast track to vaccine discovery: identification of a novel protective antigen for Group B
638 Streptococcus hypervirulent strain COH1. *Mol. Cell Proteomics* **2009**, 8, 1728-1737.
- 639 (43) Barbey, C.; Budin-Verneuil, A.; Cauchard, S.; Hartke, A.; Laugier, C.; Pichereau, V.; Petry, S.
640 Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from Rhodococcus equi ATCC 33701. *Vet.*
641 *Microbiol.* **2009**, 135, 334-345.
- 642 (44) Hecker, M.; Becher, D.; Fuchs, S.; Engelmann, S. A proteomic view of cell physiology and virulence
643 of Staphylococcus aureus. *Int. J. Med. Microbiol.* **2009**, , .
- 644 (45) Schaumburg, J.; Diekmann, O.; Hagendorff, P.; Bergmann, S.; Rohde, M.; Hammerschmidt, S.;
645 Jansch, L.; Wehland, J.; Kärst, U. The cell wall subproteome of Listeria monocytogenes. *Proteomics* **2004**, 4,
646 2991-3006.
- 647 (46) Sibbald, M. J. J. B.; Ziebandt, A. K.; Engelmann, S.; Hecker, M.; de Jong, A.; Harmsen, H. J. M.;
648 Raangs, G. C.; Stokroos, I.; Arends, J. P.; Dubois, J. Y. F.; van Dijl, J. M. Mapping the pathways to
649 staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, 70, 755-788.
- 650 (47) Furuya, H.; Ikeda, R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of
651 Staphylococcus aureus and alpha-(1->3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of
652 Cryptococcus neoformans. *Microbiology* **2009**, 155, 2707-2713.
- 653 (48) Söderberg, M. A.; Cianciotto, N. P. A Legionella pneumophila peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
654 present in culture supernatants is necessary for optimal growth at low temperatures. *Appl. Environ.*
655 *Microbiol.* **2008**, 74, 1634-1638.
- 656 (49) Kunert, A.; Losse, J.; Gruszyn, C.; Hühn, M.; Kaendler, K.; Mikkat, S.; Volke, D.; Hoffmann, R.;
657 Jokiranta, T. S.; Seeberger, H.; Moellmann, U.; Hellwage, J.; Zipfel, P. F. Immune evasion of the human
658 pathogen Pseudomonas aeruginosa: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J.*
659 *Immunol.* **2007**, 179, 2979-2988.
- 660 (50) Tsugawa, H.; Ito, H.; Ohshima, M.; Okawa, Y. Cell adherence-promoted activity of Plesiomonas
661 shigelloides groEL. *J. Med. Microbiol.* **2007**, 56, 23-29.

- 662 (51) Feng, Y.; Pan, X.; Sun, W.; Wang, C.; Zhang, H.; Li, X.; Ma, Y.; Shao, Z.; Ge, J.; Zheng, F.; Gao, G.
663 F.; Tang, J. Streptococcus suis enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell
664 surface. *J. Infect. Dis.* **2009**, 200, 1583-1592.
- 665 (52) Pissavin, C.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Characterization of a periplasmic peptidyl-prolyl cis-trans
666 isomerase in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, 157, 59-65.
- 667 (53) Bergonzelli, G. E.; Granato, D.; Pridmore, R. D.; Marvin-Guy, L. F.; Donnicola, D.; Corthésy-
668 Theulaz, I. E. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in
669 interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 425-434.
- 670 (54) Papanephytou, C. P.; Pantazaki, A. A.; Kyriakidis, D. A. An extracellular polyhydroxybutyrate
671 depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 83, 659-668.
- 672 (55) Barthe, P.; Roumestand, C.; Canova, M. J.; Kremer, L.; Hurard, C.; Molle, V.; Cohen-Gonsaud, M.
673 Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism.
674 *Structure* **2009**, 17, 568-578.
- 675 (56) Weldingh, K.; Rosenkrands, I.; Jacobsen, S.; Rasmussen, P. B.; Elhay, M. J.; Andersen, P. Two-
676 dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and
677 characterization of six novel proteins. *Infect. Immun.* **1998**, 66, 3492-3500.
- 678 (57) Villarino, A.; Duran, R.; Wehenkel, A.; Fernandez, P.; England, P.; Brodin, P.; Cole, S. T.; Zimny-
679 Arndt, U.; Jungblut, P. R.; Cerveñansky, C.; Alzari, P. M. Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein
680 kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated
681 interactions. *J. Mol. Biol.* **2005**, 350, 953-963.
- 682 (58) He, X.; Zhuang, Y.; Zhang, X.; Li, G. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins
683 of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. *Microbes Infect.* **2003**, 5, 851-856.
- 684 (59) Sumby, P.; Whitney, A. R.; Graviss, E. A.; DeLeo, F. R.; Musser, J. M. Genome-wide analysis of
685 group a streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *PLoS*
686 *Pathog.* **2006**, 2, e5.
- 687 (60) Dumas, E.; Meunier, B.; Berdagué, J.; Chambon, C.; Desvaux, M.; Hébraud, M. Comparative
688 analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation
689 between protein expression and serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 7399-7409.
- 690 (61) van der Woude, M. W.; Bäumlér, A. J. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol.*
691 *Rev.* **2004**, 17, 581-611, table of contents.
- 692 (62) Behr, M. A.; Sherman, D. R. Mycobacterial virulence and specialized secretion: same story, different
693 ending. *Nat. Med.* **2007**, 13, 286-287.
- 694 (63) McKean, S. C.; Davies, J. K.; Moore, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence
695 factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a
696 role in macrophage death. *Microbiology* **2007**, 153, 2203-2211.

- 697 (64) Hodgson, A. L.; Krywult, J.; Corner, L. A.; Rothel, J. S.; Radford, A. J. Rational attenuation of
698 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect.*
699 *Immun.* **1992**, 60, 2900-2905.
- 700 (65) McNamara, P. J.; Bradley, G. A.; Songer, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene
701 results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **1994**, 12, 921-930.
- 702 (66) Moore, R. J.; Rothel, L.; Krywult, J.; Radford, A. J.; Lund, K.; Hodgson, A. L. Foreign gene
703 expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* **1999**, 18,
704 487-497.
- 705 (67) Song, T.; Song, S.; Raman, S.; Anaya, M.; Husson, R. N. Critical role of a single position in the -35
706 element for promoter recognition by *Mycobacterium tuberculosis* SigE and SigH. *J. Bacteriol.* **2008**, 190,
707 2227-2230.
- 708 (68) Walker, J.; Jackson, H. J.; Eggleton, D. G.; Meeusen, E. N.; Wilson, M. J.; Brandon, M. R.
709 Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against
710 caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.* **1994**, 62, 2562-2567.
- 711 (69) Koonin, E. V.; Makarova, K. S.; Aravind, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification
712 and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, 55, 709-742.
- 713 (70) Nogueira, T.; Rankin, D. J.; Touchon, M.; Taddei, F.; Brown, S. P.; Rocha, E. P. C. Horizontal gene
714 transfer of the secretome drives the evolution of bacterial cooperation and virulence. *Curr. Biol.* **2009**, 19,
715 1683-1691.
- 716 (71) Hett, E. C.; Rubin, E. J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol.*
717 *Mol. Biol. Rev.* **2008**, 72, 126-56, table of contents.
- 718 (72) Allen, C. E.; Schmitt, M. P. HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the
719 utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **2009**, 191, 2638-2648.
- 720 (73) Puech, V.; Chami, M.; Lemassu, A.; Lanéelle, M. A.; Schiffler, B.; Gounon, P.; Bayan, N.; Benz, R.;
721 Daffé, M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in
722 the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **2001**, 147, 1365-1382.
- 723 (74) Jordan, S.; Hutchings, M. I.; Mascher, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria.
724 *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 107-146.
- 725 (75) Hartmann, M.; Barsch, A.; Niehaus, K.; Pühler, A.; Tauch, A.; Kalinowski, J. The glycosylated cell
726 surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular
727 communication of *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **2004**, 182, 299-312.
- 728 (76) Sakamoto, J.; Shibata, T.; Mine, T.; Miyahara, R.; Torigoe, T.; Noguchi, S.; Matsushita, K.; Sone, N.
729 Cytochrome c oxidase contains an extra charged amino acid cluster in a new type of respiratory chain in the
730 amino-acid-producing Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **2001**, 147,
731 2865-2871.

- 732 (77) Tsuge, Y.; Ogino, H.; Teramoto, H.; Inui, M.; Yukawa, H. Deletion of cgR_1596 and cgR_2070,
733 encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R. *J.*
734 *Bacteriol.* **2008**, 190, 8204-8214.
- 735 (78) Stubben, C. J.; Duffield, M. L.; Cooper, I. A.; Ford, D. C.; Gans, J. D.; Karlyshev, A. V.; Lingard,
736 B.; Oyston, P. C. F.; de Rochefort, A.; Song, J.; Wren, B. W.; Titball, R. W.; Wolinsky, M. Steps toward
737 broad-spectrum therapeutics: discovering virulence-associated genes present in diverse human pathogens.
738 *BMC Genomics* **2009**, 10, 501.
- 739 (79) Janson, H.; Melhus, A.; Hermansson, A.; Forsgren, A. Protein D, the glycerophosphodiester
740 phosphodiesterase from *Haemophilus influenzae* with affinity for human immunoglobulin D, influences
741 virulence in a rat otitis model. *Infect. Immun.* **1994**, 62, 4848-4854.
- 742 (80) Braun, V Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.*
743 **2001**, 291, 67-79.
- 744 (81) Roe, M. R.; Griffin, T. J. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for
745 studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics* **2006**, 6, 4678-4687.
- 746 (82) Panchaud, A.; Affolter, M.; Moreillon, P.; Kussmann, M. Experimental and computational
747 approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics* **2008**, 71, 19-33.
- 748
- 749
- 750
- 751

752 FIGURE LEGENDS

753
754 **Figure 1. Analysis of the extracellular proteins of two different *C. pseudotuberculosis* strains allowed**
755 **for identification of the core and variant exoproteomes.** TPP-extracted extracellular proteins of the strains
756 1002 and C231 of *C. pseudotuberculosis* were submitted to LC-MS^E analysis. The Venn-diagram shows the
757 numbers of commonly identified and variant exoproteins between the strains. The number of replicates in
758 which a given protein was observed, the average peptides identified per protein, and the average sequence
759 coverage of the proteins in each exoproteome studied, are shown as frequency distributions for comparison
760 purposes.

761
762 **Figure 2. Most of the identified *C. pseudotuberculosis* exoproteins were predicted by the SurfG+**
763 **program as having an extracytoplasmic localization.** The proteins identified in the exoproteomes of each
764 *C. pseudotuberculosis* strain were analyzed by SurfG+ and attributed a probable final sub-cellular
765 localization. Proteins classified as having a cytoplasmic localization were further analyzed with the
766 SecretomeP tool for prediction of non-classical (leaderless) secretion. Besides, literature evidence for
767 exportation by non-classical pathways was also used to re-classify the cytoplasmic proteins (see text for
768 details). SE = secreted; PSE = potentially surface exposed; C = cytoplasmic; M = membrane; NCS = non-
769 classically secreted.

770
771 **Figure 3. Differential expression of the proteins composing the core *C. pseudotuberculosis***
772 **exoproteome, evaluated by label-free relative quantification using LC-MS^E.** Results are shown as natural
773 log scale of the relative quantifications (1002:C231) for each protein. Only proteins that were given a
774 variation score higher than 250 by PLGS quantification algorithm are presented. Proteins regulated more than
775 2-fold in each strain are indicated. Identification numbers correspond to the order in which the proteins
776 appear in Table 1.

777
778 **Figure 4. Comparative analysis of corynebacterial exoproteomes.** (A) Numbers of extracellular proteins
779 identified in previous corynebacterial exoproteome analyses (pathogenic: *C. diphtheriae* C7s(-)^{tox-} and *C.*
780 *jeikeium* K411;^{17,32} non-pathogenic: *C. glutamicum* ATCC13032 and *C. efficiens* YS-314^{31,33}), in
781 comparison to those identified in this study with the two strains of *C. pseudotuberculosis*. (B) Four-group
782 Venn diagrams showing the distribution of ortholog proteins of the *C. pseudotuberculosis* experimental
783 exoproteins throughout other experimentally confirmed corynebacterial exoproteomes,^{17,31-33} as determined
784 through Blast-p similarity searches.

Table 1 – Proteins composing the core *C. pseudotuberculosis* exoproteome, identified by LC-MS^E

	Protein description	Gene ID ^a in strain:		M _r / pI ^b	Ortholog ^c		Predicted localization by SurfG+ ^d	Number of peptides observed ^e		Sequence coverage (%) ^f	
		1002	C231		Organism	E-value		1002	C231	1002	C231
1	Conserved hypothetical protein	Cp1002_0014	CpC231.0013	17.81 / 4.21	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻²⁷	E (S)	19	5	34.5	27.5
2	Putative membrane protein	Cp1002_0960	CpC231.1015	41.30 / 5.83	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻³⁶	E (PSE)	52	24	47.0	48.5
3	Conserved putative secreted protein	Cp1002_0658	CpC231.0699	30.00 / 5.20	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁶¹	E (S)	20	14	42.1	38.6
4	Putative membrane protein	Cp1002_0959	CpC231.1014	71.00 / 5.47	<i>C. striatum</i>	5e ⁻¹⁰¹	E (PSE)	63	24	63.6	38.5
5	Putative cytochrome c oxidase subunit II	Cp1002_1524	CpC231.1622	40.20 / 6.02	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (PSE)	18	14	33.3	31.9
6	Conserved hypothetical protein	Cp1002_1479	CpC231.1580	84.15 / 5.40	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (PSE)	48	31	49.9	41.9
7	Putative membrane protein	Cp1002_0464	CpC231.0459	32.54 / 8.58	<i>C. diphtheriae</i>	3e ⁻⁶⁹	E (PSE)	26	13	49.2	40.0
8	Conserved hypothetical protein	Cp1002_1787	CpC231.1886	11.60 / 9.30	<i>C. pseudogenitali</i>	9e ⁻⁰⁵	M	3	2	34.8	28.8
9	Secreted protein NLP/P60 family	Cp1002_1533	CpC231.1631	37.00 / 5.81	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻¹¹⁰	E (S)	13	11	36.8	32.3
10	Putative esterase	Cp1002_0988	CpC231.1043	70.30 / 5.61	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (S) §	43	27	53.3	37.8
11	Putative invasion protein	Cp1002_1881	CpC231.1979	61.40 / 5.58	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (S)	60	45	53.5	56.7
12	Putative htaC / HtaA family protein	Cp1002_1480	CpC231.1581	32.00 / 8.55	<i>C. diphtheriae</i>	7e ⁻⁹⁸	E (PSE)	30	19	42.6	48.4
13	NLP/P60 family secreted protein	Cp1002_1532	CpC231.1630	21.41 / 7.00	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁹¹	E (S)	2	1	10.5	5.3
14	Putative surface-anchored membrane protein	Cp1002_2043	CpC231.0595	123.00/ 5.04	<i>C. striatum</i>	0	E (PSE) ¥	104	70	56.0	57.4
15	Hypothetical protein	Cp1002_0130	CpC231.0128	24.27 / 9.24	<i>D. fermentans</i>	1.7	C * /E (S)	13	13	44.2	48.5
16	Resuscitation-promoting factor RpfA	Cp1002_0950	CpC231.0991	21.42 / 6.07	<i>C. diphtheriae</i>	5e ⁻⁸⁰	E (S)	11	8	37.5	36.2
17	Putative penicillin-binding protein	Cp1002_2019	CpC231.0619	77.16 / 8.67	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (S) / (PSE)	15	13	28.8	24.2
18	Putative secreted protein	Cp1002_0398	CpC231.0392	27.33 / 9.07	<i>C. diphtheriae</i>	4e ⁻⁸⁴	E (S)	14	9	49.0	37.2
19	Putative surface-anchored protein	Cp1002_2040	CpC231.0598	90.60 / 5.10	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻¹⁵⁹	E (S) / (PSE)	40	42	48.2	52.5
20	Hypothetical protein	Cp1002_0331	CpC231.0325	44.10 / 9.24	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻¹²	E (PSE)	14	16	39.9	44.9

21	Hypothetical protein	Cp1002_2054	CpC231.2105	14.56 / 4.89	<i>C. hylemonae</i>	0.34	E (S)	13	13	38.4	51.8
22	Putative exported esterase hydrolase	Cp1002_0637	CpC231.0679	32.90 / 6.20	<i>C. diphtheriae</i>	8e ⁻⁷⁶	C	8	7	26.7	21.5
23	Putative membrane protein	Cp1002_1552	CpC231.1650	24.61/10.24	<i>C. diphtheriae</i>	7e ⁻⁵⁴	E (PSE)	5	12	26.0	45.5
24	Putative heme transport associated protein	Cp1002_0460	CpC231.0455	64.00 / 5.82	<i>C. ulcerans</i>	0	E (PSE)	23	24	39.7	42.4
25	Putative efflux system protein	Cp1002_1057	CpC231.1115	59.60 / 5.60	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁸⁰	E (PSE)	26	25	50.3	44.4
26	Putative phosphatase	Cp1002_0379	CpC231.0373	44.31 / 7.76	<i>C. jeikeium</i>	2e ⁻¹¹⁹	E (S)	12	14	30.0	29.6
27	Putative surface-anchored membrane protein	Cp1002_0174	CpC231.0173	118.41/5.68	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (PSE) ¥	37	52	33.6	43.8
28	Resuscitation-promoting factor RpfB	Cp1002_0864	CpC231.0905	40.22 / 5.06	<i>C. diphtheriae</i>	5e ⁻¹⁴²	E (S)	20	18	39.6	36.1
29	Putative secreted hydrolase	Cp1002_0545	CpC231.0540	32.00 / 9.45	<i>C. lipophiloflavum</i>	7e ⁻⁵⁴	E (S)	6	11	30.3	37.0
30	Putative esterase	Cp1002_0986	CpC231.1041	36.60 / 7.00	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻¹³³	E (S)	10	9	27.7	25.5
31	Putative secreted hydrolase	Cp1002_0240	CpC231.0236	28.83 / 8.84	<i>C. aurimucosum</i>	2e ⁻⁶⁴	E (S)	8	9	41.4	39.3
32	Surface layer protein A	Cp1002_0246	CpC231.0242	38.60 / 5.90	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻¹⁴¹	E (S)	29	19	59.6	38.1
33	Putative trypsin-like serine protease	Cp1002_1093	CpC231.1154	42.00 / 5.22	<i>C. diphtheriae</i>	4e ⁻¹⁰⁴	E (S)	28	26	51.5	56.5
34	Putative major secreted protein PS1	Cp1002_1202	CpC231.1264	42.00 / 7.06	<i>C. glutamicum</i>	2e ⁻¹⁰³	E (S)	11	15	39.4	33.1
35	Putative sialidase precursor	Cp1002_0397	CpC231.0391	75.00 / 5.05	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (S)	42	29	48.6	41.6
36	Putative trypsin-like serine protease	Cp1002_0783	CpC231.0822	28.43 / 9.10	<i>C. diphtheriae</i>	9e ⁻⁵⁷	E (S)	10	7	33.8	26.7
37	Putative peptide transport system secreted protein	Cp1002_0787	CpC231.0826	57.30 / 4.88	<i>C. diphtheriae</i>	0	E (PSE) +	11	14	25.9	29.4
38	Putative transglycosylase	Cp1002_0930	CpC231.0971	31.65 / 9.52	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻⁹⁶	E (S) §	3	6	13.9	20.7
39	Putative peptidoglycan recognition protein	Cp1002_0972	CpC231.1027	70.00 / 5.00	<i>C. glutamicum</i>	4e ⁻¹⁶⁴	E (S)	13	13	22.7	20.4
40	Secreted subtilisin-like peptidase	Cp1002_1314	CpC231.1408	64.54 / 5.38	<i>D. nodosus</i>	2e ⁻⁹⁵	E (S)	14	11	26.3	26.6
41	Putative peptidyl prolyl cis trans isomerase A	Cp1002_0020	CpC231.0019	19.30 / 4.82	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁸⁶	C #	5	5	29.2	29.8
42	Hemin receptor precursor	Cp1002_0461	CpC231.0456	40.50 / 4.96	<i>C. ulcerans</i>	5e ⁻¹⁷⁵	E (PSE) +	12	9	34.2	37.5

43	Metalloendopeptidase like membrane protein	Cp1002_0902	CpC231.0943	24.85 / 7.23	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁹¹	E (PSE)	5	6	26.4	39.2
44	Putative serine protease	Cp1002_0883	CpC231.0924	49.01 / 5.29	<i>C. diphtheriae</i>	4e ⁻¹⁴¹	C * / E (PSE)	6	10	18.9	22.6

787 Proteins above the thick line were considered to be differentially expressed in the two strains, according to the PLGS v2.4 quantification algorithm (see text). Numbering of the proteins refers to Figure 3.

788 ^a Identification in the completed sequenced genomes of the *C. pseudotuberculosis* strains (unpublished).

789 ^b Theoretical molecular weights (Mr) and isoelectric points (pI), calculated by the Compute pI/MW tool (ExPASy tools).

790 ^c Major similarity found by Blast-p against the nr database: *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium ulcerans*; *Corynebacterium glutamicum*; *Corynebacterium striatum*; *Corynebacterium jeikeium*; *Corynebacterium aurimucosum*; *Corynebacterium lipophiloflavum*; *Corynebacterium pseudogenitalium*; *Dyadobacter fermentans*; *Clostridium hylemonae*; *Dichelobacter nodosus*.

791 ^d E = extracytoplasmic; S = secreted; PSE = potentially surface exposed; C = cytoplasmic; M = membrane.

792 ^{e, f} Average values calculated from three experimental replicates.

793 § Predicted Tat-associated signal peptide.

794 + Predicted lipoprotein.

795 ¥ Predicted LPXTG cell wall-anchoring motif.

796 * SecretomeP prediction of non-classical secretion.

797 # Extensive literature evidence for exportation by non-classical pathways.

787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801

802

803

804

805

Table 2 – Variant exoproteome of the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis*

Protein description	Gene ID ^a	M _r / pI ^b	Ortholog ^c		Predicted localization by SurfG+ ^d	Number of peptides observed ^e	Sequence coverage (%) ^f
			Organism	E-value			
Putative trypsin-like serine protease	Cp1002_0583	41.00 / 8.53	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻¹⁰⁰	E (S) §	16	43.1
Conserved hypothetical protein	Cp1002_1184	19.50 / 5.30	<i>C. glutamicum</i>	4e ⁻⁴⁸	E (S) §	4	29.7
Putative secreted protein	Cp1002_0201	51.45 / 5.43	<i>C. matruchotii</i>	6e ⁻¹²⁷	E (S) §	18	37.4
Putative hydrolase	Cp1002_0066	43.64 / 5.36	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻¹²⁰	E (S)	10	25.6
PAP2 acid phosphatase	Cp1002_0379	44.21 / 7.90	<i>C. jeikeium</i>	4e ⁻¹¹⁷	E (S)	12	30.0
Hypothetical protein	Cp1002_0780	24.20 / 5.34	<i>C. diphtheriae</i>	5e ⁻⁵⁴	E (S)	5	30.8
Putative exported lipase	Cp1002_1145	44.04 / 5.03	<i>C. diphtheriae</i>	4e ⁻¹²⁶	E (S)	4	13.5
Hypothetical protein	Cp1002_0572	22.00 / 6.59	<i>G. bronchialis</i>	2e ⁻⁰⁶	E (S)	8	35.1
Putative amino deoxychorismate lyase	Cp1002_1809	41.10 / 5.12	<i>C. diphtheriae</i>	7e ⁻¹⁶⁵	E (S)	6	21.6
Putative secreted protein	Cp1002_1588	23.07 / 4.59	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻³⁷	E (PSE) +	5	28.0
Putative secreted protein	Cp1002_0325	57.80 / 5.15	<i>C. jeikeium</i>	3e ⁻¹⁵⁹	E (PSE) +	15	34.8
co-chaperonin GroES	Cp1002_0428	10.60 / 4.49	<i>C. diphtheriae</i>	3e ⁻⁴⁸	C #	5	36.4
Phosphoglyceromutase	Cp1002_0267	27.51 / 5.25	<i>C. diphtheriae</i>	5e ⁻¹²⁵	C #	8	39.1
Elongation factor Tu	Cp1002_0348	44.00 / 4.86	<i>C. diphtheriae</i>	0	C #	12	45.2
Elongation factor Ts	Cp1002_1644	29.40 / 5.06	<i>C. diphtheriae</i>	6e ⁻¹³¹	C #	13	49.9
Transcription elongation factor GreA	Cp1002_0826	19.01 / 4.83	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻⁸⁷	C *	8	43.7
Hypothetical protein	Cp1002_0330	15.35 / 8.72	<i>A. ferrooxidans</i>	1.2	C *	5	45.2
Peroxiredoxin	Cp1002_1790	15.70 / 4.56	<i>C. glutamicum</i>	3e ⁻⁴⁸	C #	2	24.7
Phosphoglycerate kinase	Cp1002_1849	42.60 / 4.68	<i>C. diphtheriae</i>	0	C #	7	20.3
Triosephosphate isomerase	Cp1002_1850	27.35 / 4.99	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻¹²¹	C #	8	36.9
Conserved hypothetical protein	Cp1002_1474	7.26 / 4.62	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻¹⁹	C *	5	58.5
Putative carbohydrate carrier protein	Cp1002_1721	9.1 / 4.06	<i>C. diphtheriae</i>	1e ⁻³⁷	C	1	14.8
FHA domain protein (OdhI)	Cp1002_1958	15.34 / 4.80	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁶⁷	C	4	38.8
Putative methylmalonyl CoA epimerase	Cp1002_0691	16.70 / 4.89	<i>C. diphtheriae</i>	2e ⁻⁷⁵	C	4	37.2
Putative lipoprotein	Cp1002_0065	48.50 / 4.71	<i>C. diphtheriae</i>	3e ⁻¹⁵⁹	C	8	24.8
Hypothetical protein	Cp1002_1140	6.64 / 4.93	No significant similarity found.	–	C	6	91.7

808
809
810
811
812
813
814
815^a Identification in the completed sequenced genomes of the *C. pseudotuberculosis* strains (unpublished).^b Theoretical molecular weights (Mr) and isoelectric points (pI), calculated by the Compute pI/MW tool (EXPASY tools).^c Major similarity found by Blast-p against the nr database: *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium matruchotii*; *Corynebacterium glutamicum*; *Corynebacterium jeikeium*; *Acidithiobacillus ferrooxidans*.^d E = extracytoplasmic; S = secreted; PSE = potentially surface exposed; C = cytoplasmic; M = membrane.^{e,f} Average values calculated from three experimental replicates.

§ Predicted Tat-associated signal peptide.

+ Predicted lipoprotein.

816 ‡ Predicted LPXTG cell wall-anchoring motif.
817 * SecretomeP prediction of non-classical secretion.
818 # Extensive literature evidence for exportation by non-classical pathways.
819
820

Table 3 – Variant exoproteome of the strain C231 of *C. pseudotuberculosis*

Protein description	Gene ID ^a	M _r / pI ^b	Ortholog ^c		Predicted localization by SurfG+ ^d	Number of peptides observed ^e	Sequence coverage (%) ^f
			Organism	E-value			
Phospholipase D (PLD)	CpC231.0026	32.45 / 8.77	<i>C.pseudotuberculosis</i>	4e ⁻¹⁷³	E (S)	11	33.6
Serine proteinase precursor (CP40)	CpC231.1108	43.00 / 6.48	<i>C.pseudotuberculosis</i>	0	E (S)	25	48.4
Hypothetical protein	CpC231.0515	27.21 / 4.77	<i>C.diphtheriae</i>	2e ⁻⁰⁶	E (S)	7	32.9
Hypothetical protein	CpC231.0380	16.80 / 8.30	<i>C. tropicalis</i>	0.87	E (S)	6	34.6
Conserved hypothetical exported protein	CpC231.0678	49.61 / 8.69	<i>C.diphtheriae</i>	7e ⁻⁹⁶	E (S)	9	19.0
Hypothetical protein	CpC231.1244	33.55 / 4.48	<i>C.diphtheriae</i>	6e ⁻⁰⁸	E (S)	12	32.7
Hypothetical protein	CpC231.1368	23.4 / 9.36	<i>C.litoralis</i>	1.2	E (S)	7	43.7
Hypothetical protein / YceI	CpC231.2039	24.73 / 5.07	<i>C.diphtheriae</i>	9e ⁻⁷⁷	E (S)	7	37.7
Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	CpC231.0034	50.75 / 5.67	<i>C.diphtheriae</i>	0	E (S)	12	29.7
Putative secreted protein	CpC231.1349	26.57 / 5.43	<i>C.diphtheriae</i>	1e ⁻⁷⁴	E (S)	7	30.3
Putative surface-anchored protein	CpC231.1100	27.85 / 9.24	<i>C. jeikeium</i>	9e ⁻²¹	E (S)	5	17.2
Putative penicillin-binding secreted protein	CpC231.0205	83.00 / 5.38	<i>C.diphtheriae</i>	0	E (S)	14	22.2
Putative membrane anchored protein	CpC231.1109	21.15 / 9.59	<i>C.diphtheriae</i>	6e ⁻¹⁶	E (S)	6	19.1
Hypothetical protein	CpC231.1126	34.65 / 5.85	<i>H.mukohataei</i>	8e ⁻⁰⁷	E (PSE)	13	36.4
Putative transcriptional regulator	CpC231.0504	55.05 / 4.97	<i>C.diphtheriae</i>	0	E (PSE)	13	38.5
Putative serine threonine protein kinase	CpC231.1638	80.10 / 4.80	<i>C.diphtheriae</i>	0	E (PSE)	10	16.2
Putative extracellular solute-binding protein	CpC231.0361	61.54 / 5.31	<i>C.glucuronolyticum</i>	0	E (PSE)	13	30.7
Putative sugar-binding secreted protein	CpC231.0381	43.93 / 5.07	<i>C.diphtheriae</i>	5e ⁻¹⁸⁰	E (PSE) +	10	30.4
Putative Zn peptidase	CpC231.1901	35.38 / 5.29	<i>C.diphtheriae</i>	3e ⁻¹¹⁰	E (PSE)	7	25.1
Putative iron transport system binding (secreted) protein	CpC231.2070	30.05 / 5.16	<i>C.diphtheriae</i>	8e ⁻¹¹⁹	E (PSE) +	6	25.2
Putative glycerophosphoryl diesterphosphodiesterase	CpC231.1033	40.28 / 5.13	<i>C. amycolatum</i>	2e ⁻¹¹³	E (PSE) +	10	32.2

Putative metal-binding like protein	CpC231.1863	20.81 / 5.48	<i>C.diphtheriae</i>	4e ⁻⁶⁵	E (PSE) +	10	51.2
Iron siderophore binding protein – FagD	CpC231.0030	37.47 / 5.05	<i>C.pseudotuberculosis</i>	0	E (PSE) +	5	16.3

824 ^a Identification in the completed sequenced genomes of the *C. pseudotuberculosis* strains (unpublished).
825 ^b Theoretical molecular weights (Mr) and isoelectric points (pI), calculated by the Compute pI/MW tool (ExpASY tools).
826 ^c Major similarity found by Blast-p against the nr database: *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium glutamicum*; *Corynebacterium amycolatum*;
827 *Candida tropicalis*; *Congregibacter litoralis*; *Halomicrobium mukohataei*.
828 ^d E = extracytoplasmic; S = secreted; PSE = potentially surface exposed; C = cytoplasmic; M = membrane.
829 ^{e, f} Average values calculated from three experimental replicates.
830 § Predicted Tat-associated signal peptide.
831 + Predicted lipoprotein.
832 ¥ Predicted LPXTG cell wall-anchoring motif.
833 * SecretomeP prediction of non-classical secretion.
834 # Extensive literature evidence for exportation by non-classical pathways.

835
836

837

838

839
840
841
842

Table 4 – Formerly and newly identified[‡] exported proteins that may be associated with the virulence phenotype of *C. pseudotuberculosis* strains

Protein Description ^a	Identified in the exoproteome of the strain ^b :		Orthologs found in other <i>Corynebacteria</i> ^c :		References
	1002	C231	Pathogenic	Non-pathogenic	
Phospholipase D – PLD	No	Yes	Yes	No	65
Iron siderophore binding protein – FagD	No	Yes	Yes	Yes	6
Serine proteinase precursor – CP40	No	Yes	No	No	68
Putative iron transport system binding (secreted) protein	No	Yes	Yes	No	12
Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	No	Yes	Yes	No	This work. 78
Putative surface-anchored membrane protein	Yes	Yes	Yes	No	This work.
Putative hydrolase (lysozyme-like)	Yes	Yes	Yes	No	This work.
Putative secreted protein	Yes	Yes	Yes	No	This work.
Putative sugar-binding secreted protein	No	Yes	Yes	No	This work.

843 [‡] The inclusion criteria followed three main requisites: (i) experimental detection of the proteins in the exoproteomes of the pathogenic *C.*
844 *diphtheriae* and *C. jeikeium*; (ii) non-detection of the proteins in the exoproteomes of the non-pathogenic *C. glutamicum* and *C. efficiens*; and
845 (iii) *in silico* detection of ortholog proteins in pathogenic, but not in non-pathogenic, corynebacteria through search of similarity against
846 public protein repositories.

847 ^a This protein list is not meant to be all-inclusive. Rather, it wants to give an overview of the exported proteins identified in this study for
848 which it was possible to speculate on a probable involvement in *C. pseudotuberculosis* virulence after comparative proteomic analyses.

849 ^b Proteins identified in this study by TPP / LC-MS^E

850 ^c Searches of similarity against publicly available protein databases using Blast-p.

851
852
853
854

Figure 1

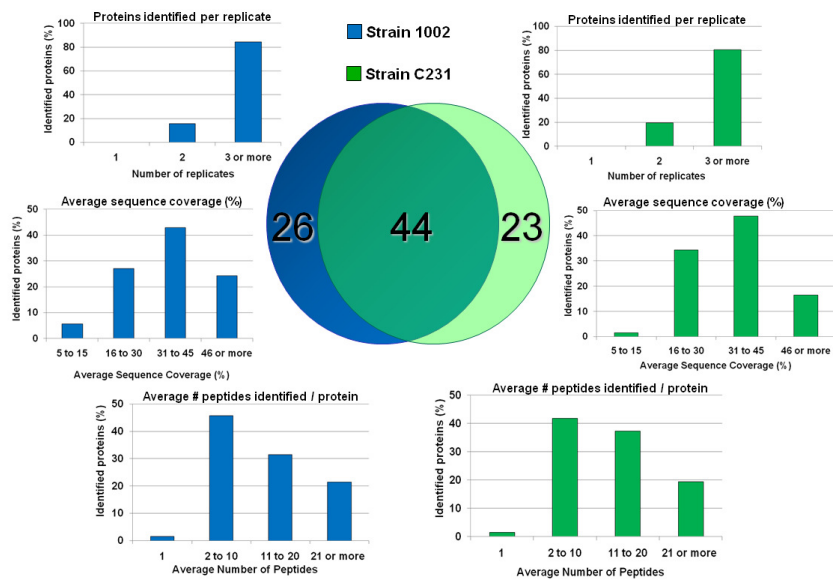


Figure 2

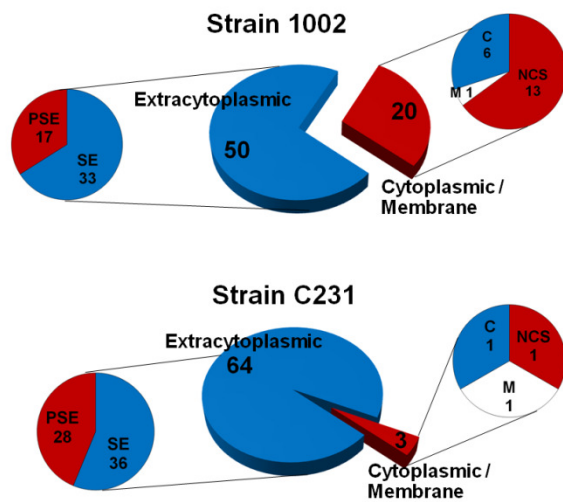


Figure 3

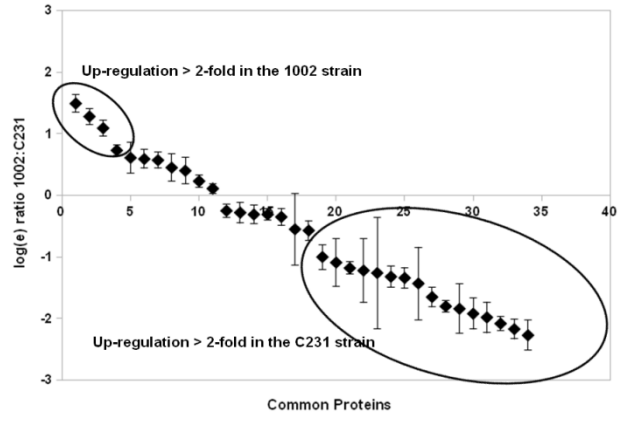
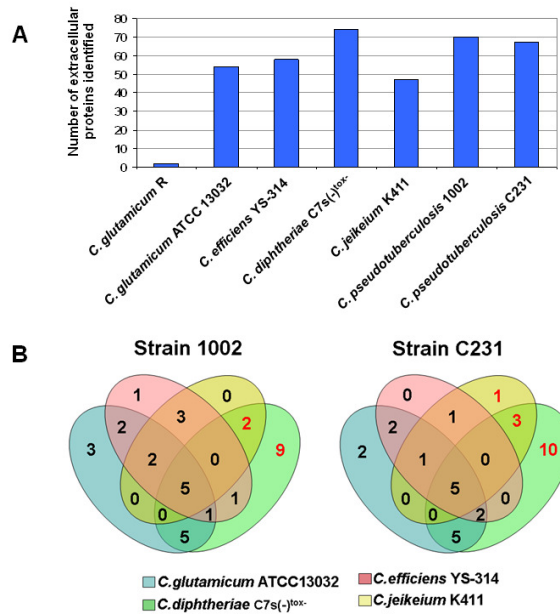


Figure 4



Supplementary Material

Supplementary Figure 1

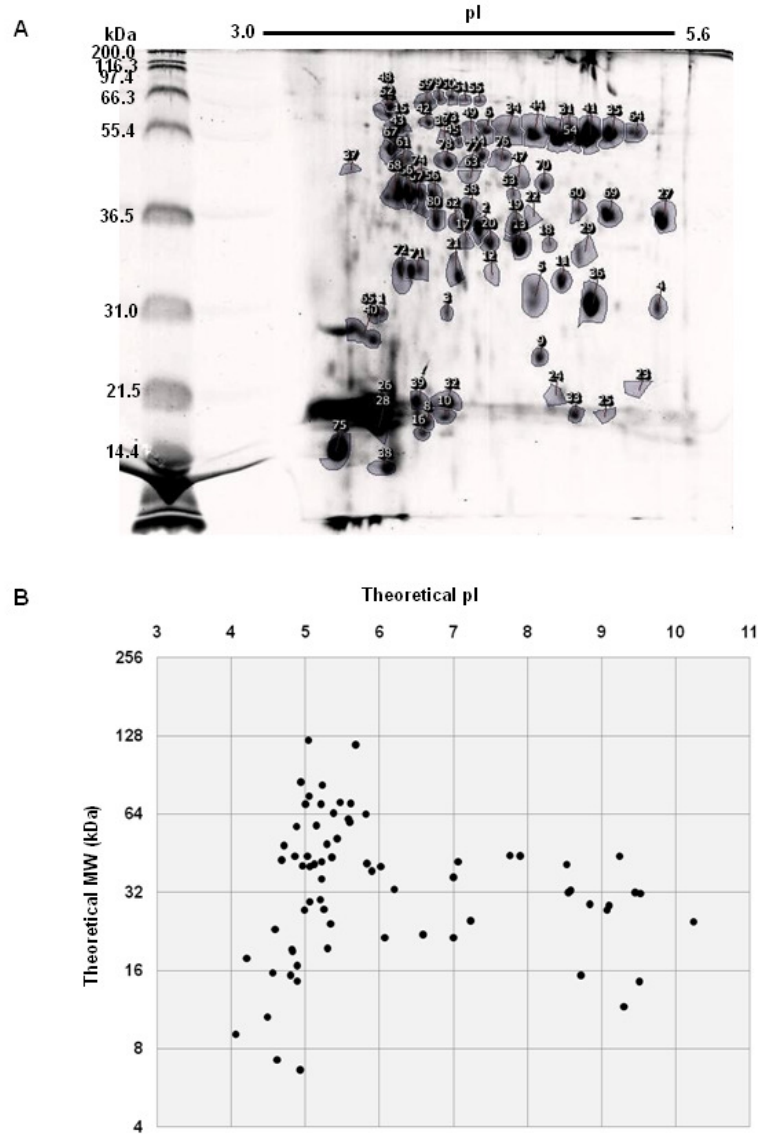


Fig. S1. Comparison between the experimental (A) and virtual (B) 2-D gels of the exoproteome of the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis*.

Supplementary Figure 2

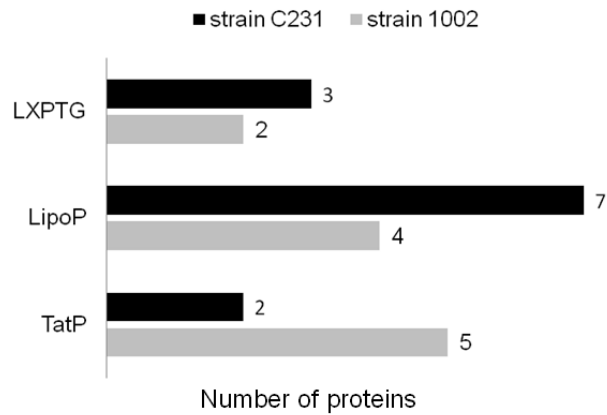


Fig. S2. Predictions of LXPTG motif-containing proteins, lipoproteins and Tat-pathway associated signal peptides in the exoproteomes of the strains 1002 and C231 of *C. pseudotuberculosis*.

Supplementary Figure 3

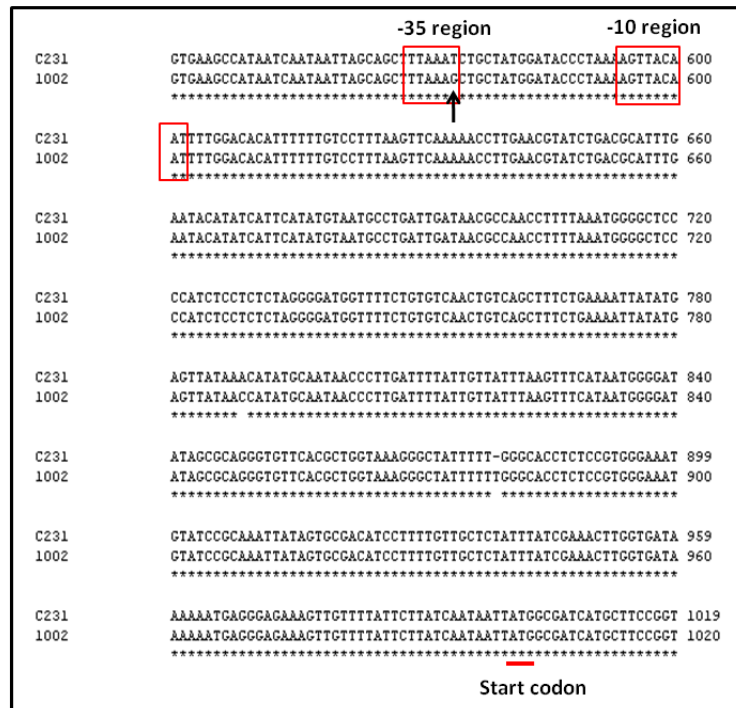


Fig. S3. Alignments of the genomic regions containing a probable promoter of the *pld* gene in the strains 1002 and C231 of *C. pseudotuberculosis*.

Supplementary Figure 4

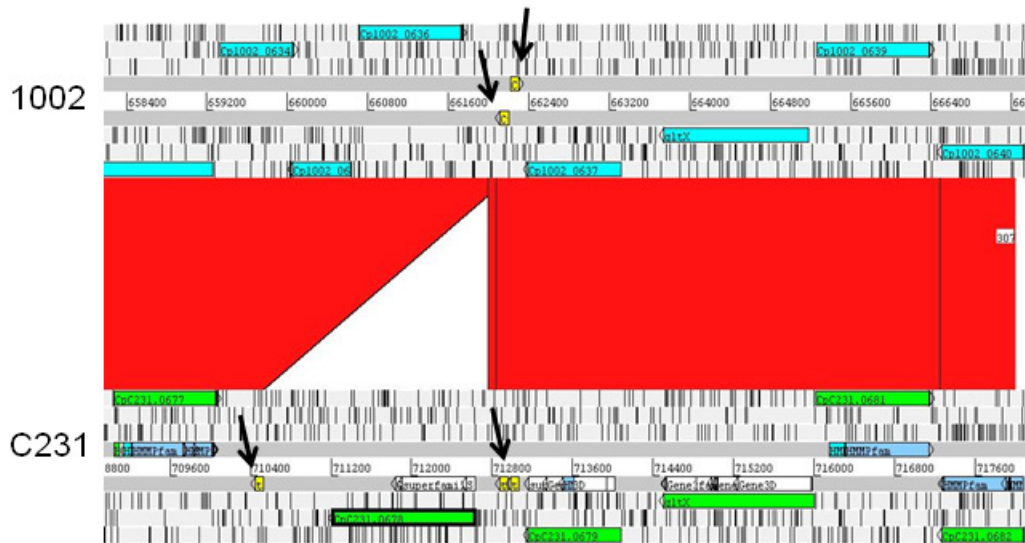


Fig. S4. A conserved hypothetical exported protein present in the Genome of the strain C231 but absent from the strain 1002 of *C. pseudotuberculosis*. The arrows point to tRNA genes.

Supplementary Table S1 – Proteins identified by MALDI-TOF MS/MS in the exoproteome of the 1002 strain.

Supplementary Table S2 – Proteins identified in the gel based experiments of *C. pseudotuberculosis* grown in BHI.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE II

Papel do Fator Sigma Alternativo σ^E na Regulação da Exportação de Proteínas em Resposta ao Estresse e na Virulência de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

6.1 Introdução

Bactérias patogênicas intracelulares facultativas, como *C. pseudotuberculosis*, alternam entre a vida livre e o ambiente dentro do hospedeiro. As condições encontradas por estas bactérias nestes dois ambientes são muito diversas, o que impõe às células bacterianas uma série de diferentes estresses aos quais elas precisam se adaptar para sobreviver. Durante a infecção, a maior parte das condições de estresse são decorrentes da resposta do organismo hospedeiro objetivando a eliminação do patógeno. Especificamente, bactérias que residem num ambiente fagossômico intracelular precisam resistir, dentre outros estresses, a alterações de pH e osmolaridade do meio externo, a alta atividade proteolítica, e às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (do inglês, ROS e RNS)(Rohde et al., 2007; Schaible, 2009).

Um dos mecanismos sofisticados utilizados pelas bactérias para responder às alterações do ambiente extracelular é a ativação transiente de genes específicos de resposta ao estresse por fatores sigma (σ) alternativos da RNA polimerase bacteriana. O maior e mais heterogêneo grupo de σ alternativos de resposta ao estresse ambiental é composto pelos fatores σ de função extracitoplasmática (ECF) (Helmann, 2002; Staron et al., 2009). Como respondem a estímulos externos, estes fatores provavelmente regulam a expressão de várias proteínas exportadas, as quais podem incluir diferentes fatores associados à virulência bacteriana (Kaushal et al., 2002; Brooks & Buchanan, 2007).

No presente estudo, foi avaliado o papel do fator σ ECF sigE na resistência de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse e na virulência desta bactéria. Particularmente, foi analisada a contribuição deste fator σ ECF para as alterações do proteoma extracelular bacteriano em resposta ao estresse gerado pelo radical óxido nítrico (NO \cdot), um agente antimicrobiano altamente reativo produzido por células fagocíticas infectadas (Hochgrafe et al., 2008; Omsland et al., 2008). Foi possível detectar alterações do exoproteoma de uma linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao NO. Além disso, os resultados deste estudo sugeriram uma importante contribuição deste fator para a resistência ao estresse nitrosativo e para o potencial infeccioso desta bactéria.

6.2 Identificação de fatores sigma ECF e construção de linhagens mutantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

6.2.1 Isolamento, clonagem e caracterização de fatores sigma ECF

Seqüências codificadoras de 16 fatores da sub-família σ ECF foram identificadas nos bancos de dados de seqüências genômicas das bactérias *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens* e *M. tuberculosis*. As seqüências obtidas foram traduzidas em seqüências protéicas e alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Após a construção de árvores filogenéticas com essas seqüências, foi possível agrupá-las como fatores *sigE*, *sigD* ou *sigH*, de acordo com a nomenclatura utilizada na anotação gênica da linhagem H37Rv da bactéria *M. tuberculosis* (Tab. 6.1).

Tabela 6.1- Agrupamento das seqüências de fatores sigma ECF utilizadas neste trabalho.

Fator sigma ECF	Seqüência ^a (organismo)
<i>sigE</i>	Rv1221 (<i>M. tuberculosis</i> H37Rv) DIP0994 (<i>C. diphtheriae</i>) NCgl1075 (<i>C. glutamicum</i>) CE1177 (<i>C. efficiens</i>)
<i>sigH</i>	Rv3223c (<i>M. tuberculosis</i> H37Rv) DIP0709 (<i>C. diphtheriae</i>) NCgl0733 (<i>C. glutamicum</i>) CE0782 (<i>C. efficiens</i>)
<i>sigD</i>	Rv3414c (<i>M. tuberculosis</i> H37Rv) DIP0577 (<i>C. diphtheriae</i>) CE0605 (<i>C. efficiens</i>)

^aSeqüências agrupadas de acordo com as análises de similaridade realizadas antes da inclusão destes fatores na anotação gênica dos Genomas destes organismos. Estão indicados os números de acesso nos respectivos bancos de dados genômicos.

As regiões de maior conservação de seqüência foram delimitadas nos fatores σ ECF identificados e foram desenhados iniciadores com posições degeneradas para tentar amplificar parcialmente as regiões codificadoras dos fatores σ ECF da *C. pseudotuberculosis* (Tab. 4.2; Fig. 6.1)

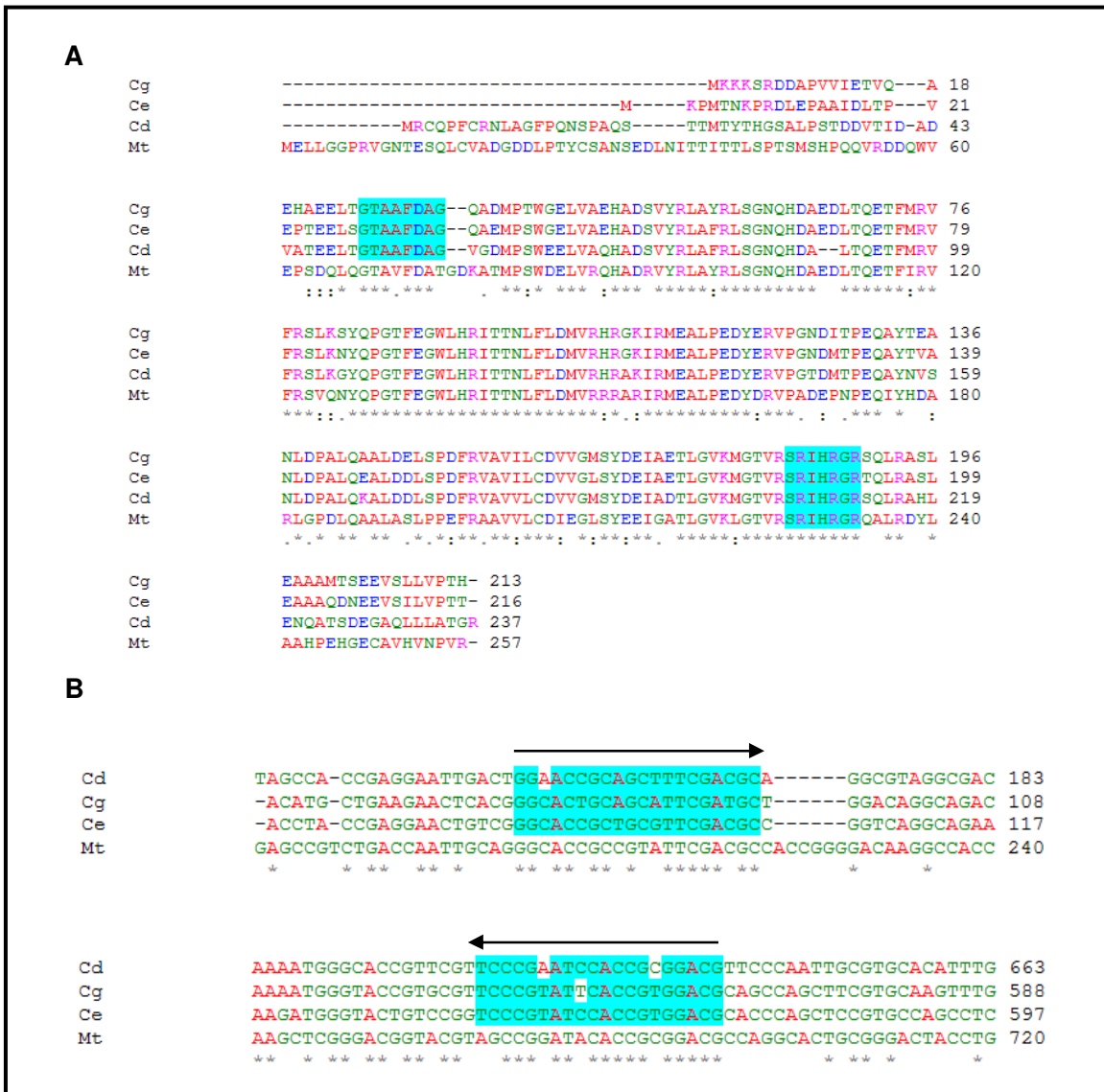


Figura 6.1. Regiões conservadas entre os fatores sigE utilizados para desenho de iniciadores degenerados. (A) Alinhamentos das seqüências protéicas dos fatores sigE. (B) Alinhamentos das seqüências nucleotídicas dos fatores sigE. Em azul – regiões utilizadas para desenho dos iniciadores. Cd = *C. diphtheriae*; Cg = *C. glutamicum*; Ce = *C. efficiens*; Mt = *M. tuberculosis*.

Como pode ser visto na figura 6.2A, as reações de PCR utilizando iniciadores degenerados geraram fragmentos amplificados de diferentes tamanhos. As bandas correspondentes aos tamanhos esperados (Tab. 4.2) foram purificadas de géis de agarose, clonadas e seqüenciadas. Esta estratégia permitiu a identificação eficiente do fator *sigE* no genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* (Fig.6.3). No entanto, naquele momento, não foi possível identificar outros fatores sigma ECF através desta metodologia, como demonstrado por alguns resultados de seqüenciamento dos fragmentos de PCR obtidos (Tab. 6.2).

Só recentemente foi possível detectar novos fatores sigma ECF da bactéria *C. pseudotuberculosis*. O fator sigK foi identificado através de análises de GSSs (Genome Survey Sequences) do Genoma desta bactéria (D'afonseca et al., 2009) (Fig.6.2B). Além disso, a finalização do processo de seqüenciamento e anotação completos do Genoma de *C. pseudotuberculosis*, no final do ano de 2009, permitiu a utilização das ferramentas disponíveis no banco MiST2 (*Microbial Signal Transduction database* – disponível em: <http://mistdb.com/>) para busca *in silico* de todos os fatores sigma ECF desta bactéria (Fig. 6.4) (Ulrich & Zhulin, 2010).

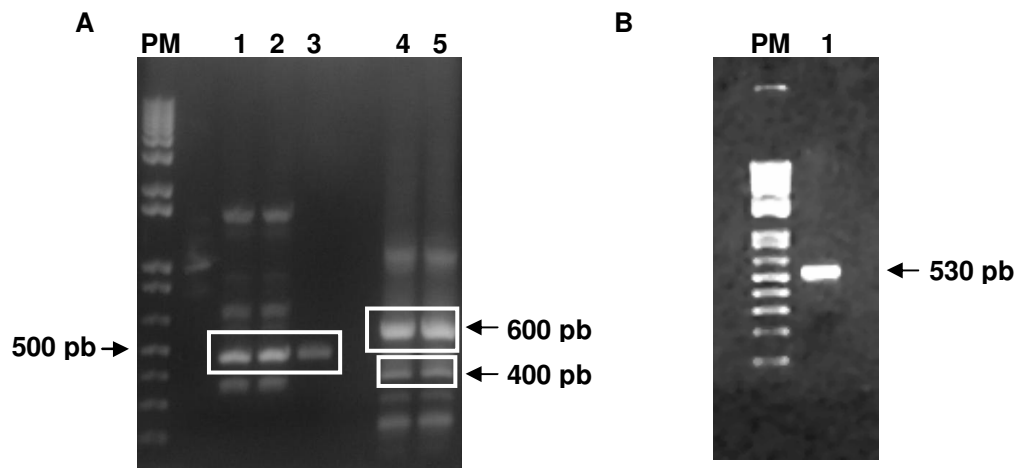




Figura 6.2. Reações de PCR utilizando iniciadores degenerados e não-degenerados para amplificação dos fatores sigma ECF. (A) Linhas 1 e 2, amplificações com iniciadores para o fator *sigH*. Linha 3, fragmento purificado de aproximadamente 470 pb representando provável fator *sigH*. Linhas 4 e 5, amplificações com iniciadores para o fator *sigD*. Os fragmentos que foram seqüenciados estão destacados. (B) linha 1, reação de PCR com iniciadores específicos para o fator *sigK*. PM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A

```
>sigE
GCCCTT CGTCCGCGGTGGATACGGGAACGGACGGTGCCCATTTTTCACGCCCAATGTATC
TGCTATCTCGTCGTAGCT CATCCCCACAACGTCACACAAGACCACC GCGACTCGGAAGT
CCGGACCAAGATCATCAAGAGCTTTTTTGCAACGCTGGATCCAAGTTGGCGATGTTATAG
GCCTGCTCCGGAGTCATGGTTGTGCCCGGCACCCGGTCGCAGTCCTCAGG CAATGCCTC
CATCCGAATCTTAGAGCGATGCCGCACCATATCTAGGAATAAGTTGGTGGT GATCCGGT
GCAGCCATCCCTCAAAAGTGCCTGGTTGGTAATTCTTCAGAGAGCGGAAGACGCGCATA
AAGGTTTCTTGTGTCAGATCCTCTGCATCATGTTGGTTACCGGAAAGCCGAAACGCCAG
GCGATAAACGCTATCTGCGTGCTC GCGGACGAGCTCTCCCCACGTAGGCATCGATCCGA
TACCAGCGTCAACGCTGCGGTTCCAAG
```

B

```
>  emb|BX248356.1  Corynebacterium diphtheriae gravis NCTC13129, complete genome;
segment 3/8
Length=347625

Features in this part of subject sequence:
  Putative ECF family RNA polymerase sigma factor

Score = 370 bits (802), Expect = 5e-100
Identities = 151/164 (92%), Positives = 158/164 (96%), Gaps = 0/164 (0%)
Frame = -1/+2

Query 497      GTAAFDAGIGSMPTWGELVAEHADSVYRLAFRLSGNQHDAEDLTQETFMRVFRSLKQYQP 318
Sbjct 274328    GTAAFDAG+G MP+W ELVA+HADSVYRLAFRLSGNQHDAEDLTQETFMRVFRSLK YQP
GTAAFDAGVGDMPWEEELVAQHADSVYRLAFRLSGNQHDAEDLTQETFMRVFRSLKGYQP 274507

Query 317      GTFEGWLHRITTNLFLDMVRHRKIRMEALPEDCDRVPGTMTPEQAYNIANLDPALQKA 138
Sbjct 274508    GTFEGWLHRITTNLFLDMVRHR+KIRMEALPED +RVPGT MTPEQAYN++NLDPALQKA
GTFEGWLHRITTNLFLDMVRHRKIRMEALPEDYERVPGTDMTPEQAYNVSNLDPALQKA 274687

Query 137      LDDLSPDFRVAVVLCDDVVGMSYDEIADTLGVKMGTVRSRIHRGR 6
Sbjct 274688    LDDL PDFRVAVVLCDDVVGMSYDEIADTLGVKMGTVRSRIHRGR 274819
```

C

```
MRCQPFRCRNLAGFPQNSPAQSTTMTYTHGSALPSTDDVTIDADVATEELT GTAAFDAGV
GDMPSWEEELVAQHADSVYRLAFRLSGNQHDAEDLTQETFMRVFRSLKGYQPGTFEGWLH
RITTNLFLDMVRHRKIRMEALPEDYERVPGTDMTPEQAYNVSNLDPALQKALDDLSPD
FRVAVVLCDDVVGMSYDEIADTLGVKMGTVRSRIHRGR SQLRAHLENQATSDEGAQLLLA
TGR
```

Figura 6.3. Identificação do fator sigma ECF *sigE* no genoma da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (A) Sequenciamento da região conservada do gene *sigE*, amplificada por PCR com iniciadores degenerados. Em azul - região codificadora do domínio conservado sigma 70-região4. Em verde - região codificadora do domínio sigma 70-região 2. (B) Principal resultado de similaridade obtido para a seqüência do fator *sigE* da *C. pseudotuberculosis*, utilizando a ferramenta tBlastx. (C) Seqüência protéica do fator *sigE* de *C. diphtheriae*. Em vermelho está destacada a região da de similaridade com a seqüência obtida do fator *sigE* de *C. pseudotuberculosis*.

Tabela 6.2. Resultados de alguns dos sequenciamentos dos fragmentos de PCR obtidos com iniciadores degenerados para os fatores *sigH* e *sigD*.

<i>Fragmento (iniciadores)</i>	<i>Gene^a</i>
500 pb (sigHcons1 / 2)	DNA helicase [<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152]
400 pb (sigDcons1 / 2)	Proteína ribossômica S10 (30S) [<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032]
600 pb (sigDcons1 / 2)	Anidrase carbônica [<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129]

^a Maior similaridade obtida em bancos de dados através de análises com a ferramenta tBlastx.

<input type="checkbox"/>	Protein ID ▲	Locus	Gene	Classification	Inputs	Outputs	Domain architecture
<input type="checkbox"/>	1. 52	Cp1002_0052	sigK	ECF			ECF 19
<input type="checkbox"/>	2. 173	Cp1002_0176	sigC	ECF			ECF 36
<input type="checkbox"/>	3. 423	Cp1002_0430	sigD	ECF			ECF 40
<input type="checkbox"/>	4. 528	Cp1002_0540	sigH	ECF			ECF 12
<input type="checkbox"/>	5. 737	Cp1002_0755	sigE	ECF			ECF 14
<input type="checkbox"/>	6. 2033	Cp1002_2086	sigM	ECF			ECF 27

Figura 6.4. Resultado das buscas *in silico* de fatores sigma ECF no Genoma completamente anotado da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. As ferramentas bioinformáticas do portal MiST2 (*Microbial Signal Transduction database* – disponível em: <http://mistdb.com/>) foram utilizadas para buscar fatores sigma ECF no Genoma de *C. pseudotuberculosis* (Ulrich & Zhulin, 2010). A figura mostra as 6 proteínas de *C. pseudotuberculosis* identificadas como fatores sigma ECF, além dos domínios encontrados em cada uma, de acordo com a classificação descrita por Staroń et al. (2009).

6.2.2 Geração da linhagem mutante 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*

Utilizando a estratégia baseada em reações de PCR com iniciadores degenerados, foi possível isolar e clonar uma região parcial de 490 pb do gene codificador do fator sigma sigE de *C. pseudotuberculosis* (Fig.6.3). Então, foi desenhada uma nova estratégia experimental para tentar gerar uma linhagem mutante para este fator através de eventos de recombinação homóloga. Uma estratégia similar já havia sido implementada anteriormente com sucesso pelo nosso grupo, dessa vez na geração de linhagens mutantes da bactéria láctica Gram+ *Lactococcus lactis* (Miyoshi et al., 2002). Combinou-se a isto a então recente otimização de um protocolo de transformação eficiente de DNA em *C. pseudotuberculosis*, também realizada pelo nosso grupo (Dorella et al., 2006c).

O plasmídeo não-replicativo contendo a região codificadora parcial do fator sigE da *C. pseudotuberculosis* (pCR[®]2.1-TOPO:sigE) foi transformado por eletroporação na linhagem 1002 a fim de gerar mutantes por eventos de recombinação homóloga simples com o gene *sigE* presente no DNA cromossômico. Após seleção em meio BHI ágar acrescido do antibiótico canamicina (25 µg/ml), foi possível recuperar dois prováveis mutantes de *C. pseudotuberculosis* com inserções do DNA plasmidiano no gene *sigE* cromossômico. A confirmação dos eventos de recombinação foi feita através de reações de PCR com iniciadores específicos para os genes *sigE* e *kan* (Fig.6.5 A e B), além de ensaio de *Southern blot* com os DNAs genômicos das linhagens selvagem e mutante, utilizando sonda para o gene *sigE* marcada radioativamente (Fig.6.5 A e D).

A amplificação de um fragmento de PCR de aproximadamente 5.000 pb somente na linhagem mutante, quando utilizados os iniciadores *sigE*-F e *sigE*-R, além da amplificação do gene *kan* também exclusivamente nesta linhagem, são indicativos da inserção específica do DNA plasmidiano na região cromossômica que contém o gene *sigE* (Fig.6.5B). A combinação de diferentes pares de iniciadores de PCR permitiu inferir a direção da inserção do plasmídeo no DNA genômico da linhagem mutante (Fig.6.5A).

O ensaio de *Southern blot* por sua vez, permitiu a visualização de uma banda marcada com a sonda para o gene *sigE* nas linhagens tipo-selvagem e duas na linhagem mutante, uma vez que o plasmídeo utilizado (pCR[®]2.1-TOPO:sigE) possui um sítio de corte interno para cada uma das enzimas de restrição empregadas, *Bgl*III e *Hind*III (Fig.6.5A e D).

Figura 6.5. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante 1002($\Delta sigE$). (A) Representação esquemática da inserção do DNA plasmidiano no gene *sigE* da bactéria *C. pseudotuberculosis*. São indicados os diferentes pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR para confirmação da inserção, bem como os diferentes sítios de corte para as enzimas de restrição utilizadas nos ensaios de *Southern blot*. (B) Reações de PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores para os genes *sigE* e *kan*, além de iniciadores M13, que se anelam nas seqüências derivadas do vetor pCR[®]2.1-TOPO:*sigE*. PM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linha 1, controle negativo; linha 2, DNAg($\Delta sigE$) + Kan-F + Kan-R; linha 3, DNAg(WT) + Kan-F + Kan-R; linha 4, DNAg($\Delta sigE$) + sigE-F + sigE-R; linha 5, DNAg(WT) + sigE-F + sigE-R; linha 6, DNAg($\Delta sigE$) + Kan-F + sigE-R; linha 7, DNAg($\Delta sigE$) + sigE-F + Kan-R; linha 8, DNAg(WT) + Kan-F + sigE-R; linha 9, DNAg(WT) + sigE-F + Kan-R; linha 10, DNAg($\Delta sigE$) + M13-R + sigE-R; linha 11, DNAg($\Delta sigE$) + M13-F + sigE-F; linha 12, DNAg(WT) + M13-R + sigE-R; linha 13, DNAg(WT) + M13-F + sigE-F. A seta destaca amplificação fraca do gene *kan*, somente na linhagem mutante. (C) Resolução eletroforética dos DNAs genômicos das linhagens de *C. pseudotuberculosis* digeridos com enzimas de restrição: linha 1, plasmídeo controle pCR2.1TOPO:*sigE*; linhas 2 e 3, DNAs das linhagens tipo-selvagem T1 e 1002 digeridos com a enzima *Bgl*III; linhas 4 e 5, DNAs das linhagens mutantes 1002($\Delta sigE$) digeridos com a enzima *Bgl*III; linhas 6 e 7, DNAs das linhagens tipo-selvagem T1 e 1002 digeridos com a enzima *Hind* III; linhas 8 e 9, DNAs das linhagens mutantes 1002($\Delta sigE$) digeridos com a enzima *Hind* III. (D) *Southern blot* com os DNAs mostrados em (C), utilizando sonda radioativa para o gene *sigE* da *C. pseudotuberculosis*. A seta aponta um fragmento abaixo do tamanho esperado devido à baixa resolução do gel na região.

6.3 Análises fenotípicas das linhagens de *C. pseudotuberculosis*

6.3.1 Curvas de crescimento das linhagens em meio rico (BHI) e em meio quimicamente definido (MQD)

A fim de avaliar se a mutação do gene *sigE* afetaria o crescimento da bactéria *C. pseudotuberculosis*, curvas de crescimento foram realizadas com as linhagens tipo-selvagem (1002wt) e mutante ($\Delta sigE$), tanto em meio rico (BHI) quanto em meio quimicamente definido (MQD) (Fig. 6.6).

O perfil de crescimento das duas linhagens foi muito similar em ambos os meios utilizados (Fig. 6.6). O crescimento foi igualmente alterado quando as linhagens foram incubadas em MQD, sendo que as duas atingiram a fase estacionária de crescimento bem antes do que acontece no crescimento em BHI, devido à menor disponibilidade de nutrientes (Fig. 6.6).

A morfologia e o tamanho das bactérias tipo-selvagem e mutantes foram avaliadas durante o crescimento exponencial, por microscopia de contraste de fase e citometria de fluxo, respectivamente (Fig. 6.7A e B). Os resultados observados para as duas linhagens estão de acordo com o que já foi descrito para a morfologia de *C. pseudotuberculosis* na literatura, *i.e.* células pleomórficas coco-bacilares com tamanho

médio em torno de 1.6 μM que formam agregados em cultura, dando origem a formas semelhantes a letras chinesas (Dorella et al., 2006a). Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens.

Em conjunto, os resultados indicam que a mutação do gene *sigE* não alterou o crescimento normal de *C. pseudotuberculosis*. Resultados similares também foram observados para outras bactérias Gram-positivas filogeneticamente próximas, incluindo *Corynebacterium glutamicum* e *Mycobacterium tuberculosis* (Manganelli et al., 2001; Park et al., 2008). Por outro lado, a mutação do gene ortólogo *rpoE*, que codifica o fator σ^E na bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, leva a alterações morfológicas incompatíveis com a viabilidade celular (Hayden & Ades, 2008). Interessantemente, o mesmo efeito não é observado na bactéria filogeneticamente relacionada *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (Muller et al., 2009).

6.3.2 Determinação das condições de estresse *in vitro* a serem testadas

Considerando as situações de estresse possivelmente encontradas por bactérias intracelulares como *C. pseudotuberculosis* durante o processo infeccioso (Rohde et al., 2007; Schaible, 2009), uma série de condições ambientais foram escolhidas para avaliar se a mutação do gene *sigE* teria algum efeito na resistência a tais estresses (Tab. 6.3). As condições testadas incluíram estresses oxidativo e nitrosativo (do inglês, ROS e RNS), estresse ácido, estresse de superfície celular, dentre outros. As concentrações iniciais dos agentes geradores de estresse foram baseadas na literatura disponível para outras bactérias patogênicas, como *M. tuberculosis* (Tab.4.4). A partir daí, foi avaliado o efeito das diversas concentrações dos diferentes agentes geradores de estresse no crescimento da linhagem tipo-selvagem de *C. pseudotuberculosis*, e concentrações sub-letais foram escolhidas para os testes com a linhagem mutante (Tab. 6.3). O meio quimicamente definido (MQD) foi preferido à utilização de meio rico, a fim de diminuir a quantidade de fatores externos que pudessem interferir com a geração dos diferentes estresses *in vitro* e com os experimentos posteriores de proteômica.

Após avaliar o efeito dos agentes geradores de estresse nas diferentes fases do crescimento de *C. pseudotuberculosis* (*lag*, exponencial e estacionária), o início da fase exponencial foi escolhido como o ponto para aplicação das condições de estresse.

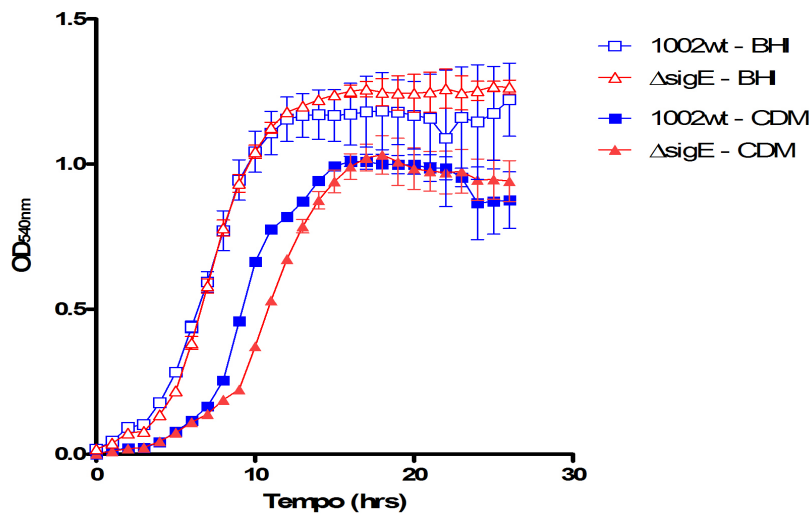


Figura 6.6. Curvas de crescimento das linhagens tipo-selvagem (1002wt) e mutante ($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*, em meio BHI e MQD. Culturas de *C. pseudotuberculosis* crescidas *overnight* em meio líquido foram diluídas 1:100 em meio fresco (BHI ou MQD), pré-aquecido a 37°C, e incubadas por mais 30 hrs com agitação constante. Medidas de densidade ótica a 540 nm foram realizadas a cada 10 minutos por um equipamento *LabSystems iEMS Absorbance Plate Reader*. A linhagem mutante 1002($\Delta sigE$) foi sempre crescida na presença do antibiótico canamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

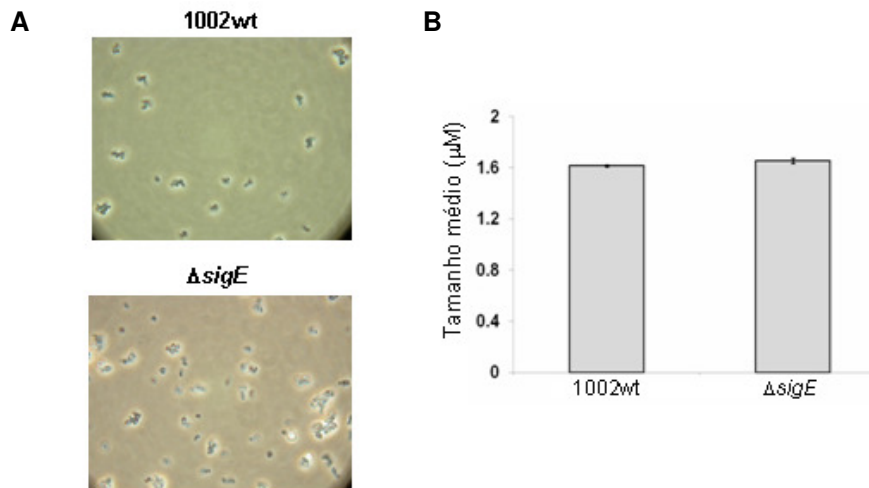


Figura 6.7. Análises morfológicas das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*. (A) Culturas vivas das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$), em fase exponencial de crescimento, foram observadas num microscópio Olympus BX60 com os comprimentos de onda alinhados para microscopia de contraste de fase, sob um aumento de 100X. (B) Bactérias marcadas com as sondas fluorescentes SYTO62 (marcador de ácidos nucleicos) e DiSC₃ (marcador de viabilidade celular) (Breeuwer & Abee, 2004) foram adquiridas, enumeradas e medidas num citômetro de fluxo do tipo CF II (CellFacts Instruments, Reino Unido) (item 4.7). O resultado apresentado é o tamanho médio das bactérias viáveis presentes nas amostras, em dois experimentos biológicos distintos.

A fase *log* inicial foi escolhida porque a resistência a algumas condições (ROS e RNS) variou bastante de acordo com a fase do crescimento em que o estresse foi aplicado (Anexo I). Além disso, a aplicação do estresse no início da fase exponencial nos permitiu acompanhar o efeito que cada condição exerceu sobre todo o crescimento das linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* (item 4.7).

Tabela 6.3. Resistência da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse

Condição de estresse	Agente gerador de estresse	Concentrações testadas	Resistência (100wt) ^a	
Escassez nutricional	Glicose	0.15 %	> 90 %	
		0.3 %	100 %	
Estresse osmótico	NaCl	0.5 M	> 90 %	
		1.0 M	50 % - 90 %	
		2 M	< 50 %	
		2.5 M	0 %	
		500µM	100 %	
		1mM	> 90 %	
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂	2,5 mM	> 90 %	
		5 mM	> 90 %	
		10 mM	50 % - 90 %	
		25 mM	< 50 %	
		40 mM	< 50 %	
		50 mM	< 50 %	
		100 mM	< 50 %	
		150 mM	< 50 %	
		200 mM	0 %	
		Estresse nitrosativo	DETA/NO*	10µM
50µM	100 %			
100µM	50 % - 90 %			
250µM	50 % - 90 %			
500µM	50 % - 90 %			
Estresse ácido	HCl	1mM	50 % - 90 %	
		pH 4.0	0 %	
		pH 4.5	< 50 %	
		pH 5.5	50 % - 90 %	
Estresse alcoólico	ETOH	pH 6.5	50 % - 90 %	
		1.25 %	> 90 %	
		2.5 %	> 90 %	
		5 %	< 50 %	
		10 %	< 50 %	
Estresse térmico	Temperatura	15 %	0 %	
		55 °C	0 %	
		50 °C	50 % - 90 %	
		4 °C	50 % - 90 %	
		Estresse de superfície celular	SDS	0.01 %
0.05 %	< 50 %			
0.1 %	0 %			
Lisozyima	250 µg/mL			100 %
	500 µg /mL			100 %
	750 µg /mL	> 90 %		
	1000 µg /mL	50 % - 90 %		

* DETA/NO = Diethylenetriaamine NONOate – agente doador de óxido nítrico (NO)

^a Início da fase *log* de crescimento.

Apesar de tentarmos reproduzir *in vitro* as prováveis condições de estresse encontradas pela bactéria *C. pseudotuberculosis* durante a infecção, a existência de um sistema que permitisse comparar a resistência das diferentes linhagens ao estresse *in vivo* seria de grande valia. A disponibilidade de camundongos nocaute para a enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) tornou estas análises particularmente possíveis para o estresse nitrosativo gerado pelo agente óxido nítrico (NO) (Wei et al., 1995).

Para tais experimentos, foi necessário inicialmente implementar um sistema que nos permitisse quantificar a geração de NO na cultura, a fim de comparar o efeito causado por concentrações biologicamente relevantes deste agente *in vitro*, com os resultados dos ensaios de infecção de camundongos nocaute iNOS^{-/-} posteriormente.

Um eletrodo para detecção de NO (IsoNO – WPI Inc.) foi estabilizado no meio quimicamente definido (MQD) utilizado para crescimento de *C. pseudotuberculosis* e, após adição de diferentes concentrações do agente DETA/NO, a liberação de óxido nítrico (NO) em cultura foi registrada (veja item 4.6). A Figura 6.8 mostra a liberação de NO em MQD após adição de 100 µM de DETA/NO. Com base em um procedimento de calibração química, no qual quantidades determinadas de NO são geradas a partir de NaNO₂ (Fig.6.8A), foi possível observar que esta quantidade de DETA/NO é capaz de gerar NO numa concentração constante, em torno de 500 nM, por até 20 horas, em pH 7.4 (Fig. 6.8B). A adição de uma concentração muito maior (1 mM) do agente DETA/NO ao sistema, levou à liberação de concentrações igualmente aumentadas de óxido nítrico (dados não mostrados). Interessantemente, a concentração de 500 nM de NO corresponde a concentrações fisiologicamente relevantes deste agente de estresse, como demonstrado em trabalhos prévios realizados por outros grupos (Malinski & Taha, 1992; Ogawa et al., 2001; Omsland et al., 2008).

Uma vez conhecidas as concentrações de NO que seriam utilizadas para gerar o estresse nitrosativo *in vitro*, achamos que também seria interessante avaliar o consumo de NO pelas bactérias em cultura. No entanto, os experimentos realizados para este fim não renderam resultados conclusivos, devido justamente à constante liberação de NO pelo agente DETA/NO, o que mascara qualquer efeito de consumo pelas bactérias (dados não mostrados) A utilização de um agente doador de NO com meia-vida de liberação muito menor que a do DETA/NO será essencial para estes estudos (Feelisch, 1998).

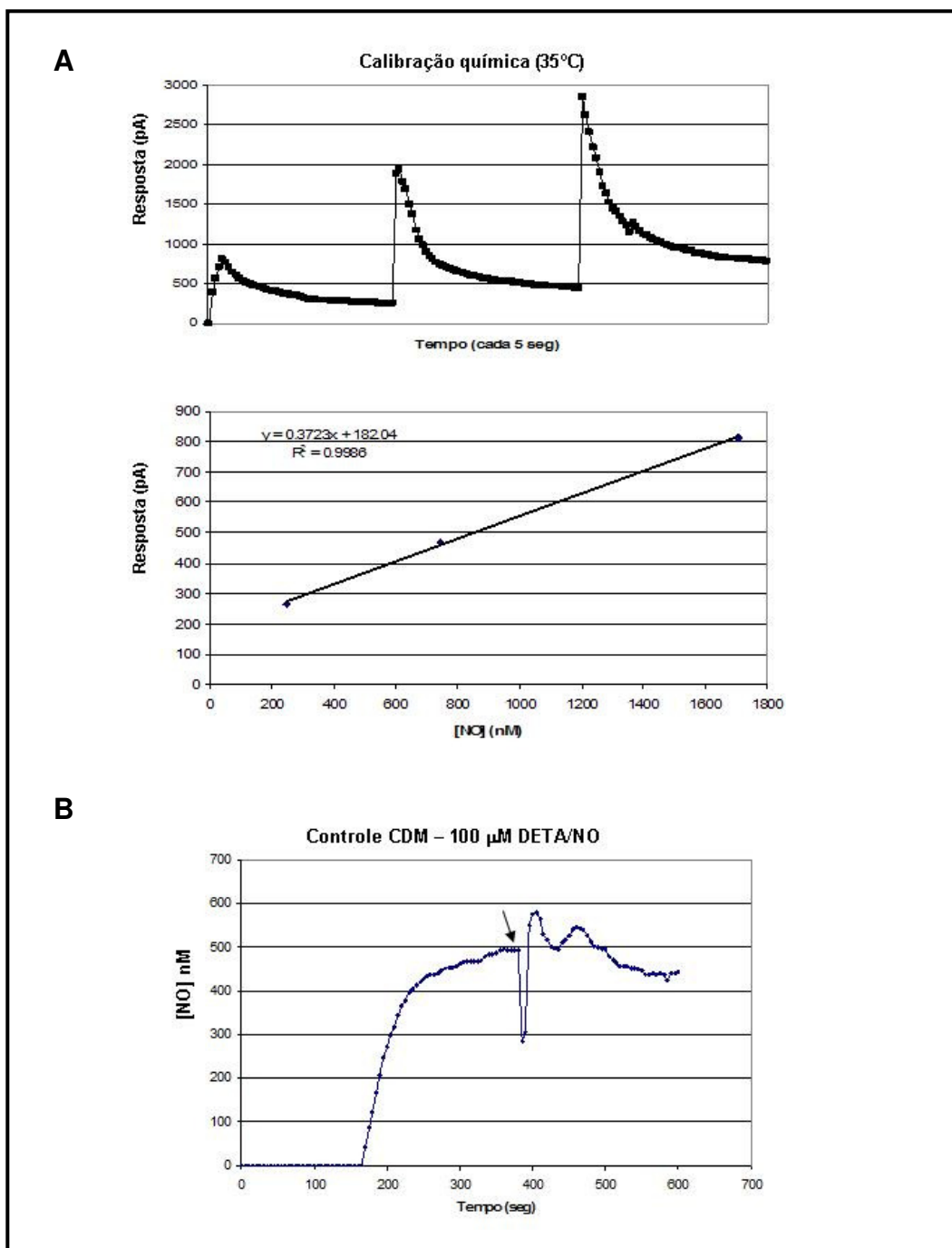


Figura 6.8. Avaliação da liberação de NO em cultura pelo agente doador DETA/NO. (A) Calibração química do eletrodo IsoNO. Quantidades definidas de NaNO_2 são adicionadas a uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{KI}$ para gerar concentrações determinadas de NO no sistema: 249 nM; 742 nM; 1708 nM. A resposta do eletrodo em pA é registrada para cada concentração e uma curva de calibração é então gerada. (B) Geração de NO em meio quimicamente definido após adição de 100 μM DETA/NO. A seta aponta o momento de adição de 100 μL PBS (pH 7.4) ao sistema, o qual retorna ao *steady-state* de liberação de NO rapidamente.

6.3.3 Resistência das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) a agentes geradores de estresse *in vitro*

As linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis* foram inoculadas em meio quimicamente definido (MQD) e os diferentes agentes geradores de estresse foram adicionados às culturas no início da fase exponencial de crescimento. A partir daí, o crescimento das bactérias foi monitorado por 24 horas. As curvas de crescimento das diferentes linhagens, tratadas ou não com os agentes geradores de estresse, foram comparadas, e o efeito dos diferentes tratamentos foi expresso como uma porcentagem do crescimento das linhagens nas condições controle (veja item 4.7).

A linhagem mutante 1002($\Delta sigE$) apresentou crescimento comparável à linhagem 1002wt quando submetida a condições de escassez nutricional (limitação de glicose) e aos estresses osmótico, térmico, alcoólico, e oxidativo (Fig.6.9). Por outro lado, a deficiência do fator sigE levou à maior sensibilidade da linhagem a concentrações fisiológicas de estresses ácido e nitrosativo, e ao estresse de superfície celular (Fig.6.9).

O envolvimento do fator sigE na resistência aos estresses de superfície celular gerados por SDS e lisozya é uma característica comum a outras Actinobactérias. Similarmente ao que foi visto para *C. pseudotuberculosis*, uma linhagem mutante $\Delta sigE$ da bactéria *C. glutamicum* foi mais sensível ao estresse de superfície, ao passo que os estresses osmótico e oxidativo não afetaram o crescimento desta bactéria. No entanto, a mutação do gene *sigE* tornou *C. glutamicum* também mais sensível ao estresse térmico, como já foi observado para a bactéria *M. tuberculosis* (Manganelli et al., 2001; Park et al., 2008). Apesar de termos observado uma resistência aparentemente maior da linhagem 1002wt ao estresse térmico (50°C), estes resultados não foram estatisticamente significativos (Fig.6.9). É importante considerar que diferentes fatores sigma ECF podem desempenhar papéis aditivos (ou redundantes) na resistência a estresses específicos (Mascher et al., 2007). Um bom indicativo disto é o controle transcricional do gene *sigE* de *M. tuberculosis* por outro fator sigma ECF, o fator sigH, em resposta ao estresse térmico (Raman et al., 2001; Mehra & Kaushal, 2009). Então, a observação de somente um pequeno aumento na sensibilidade da linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* ao estresse térmico neste trabalho pode ser devida à uma resistência orquestrada por diferentes fatores sigma ECF a esta condição ambiental, incluindo σ^E .

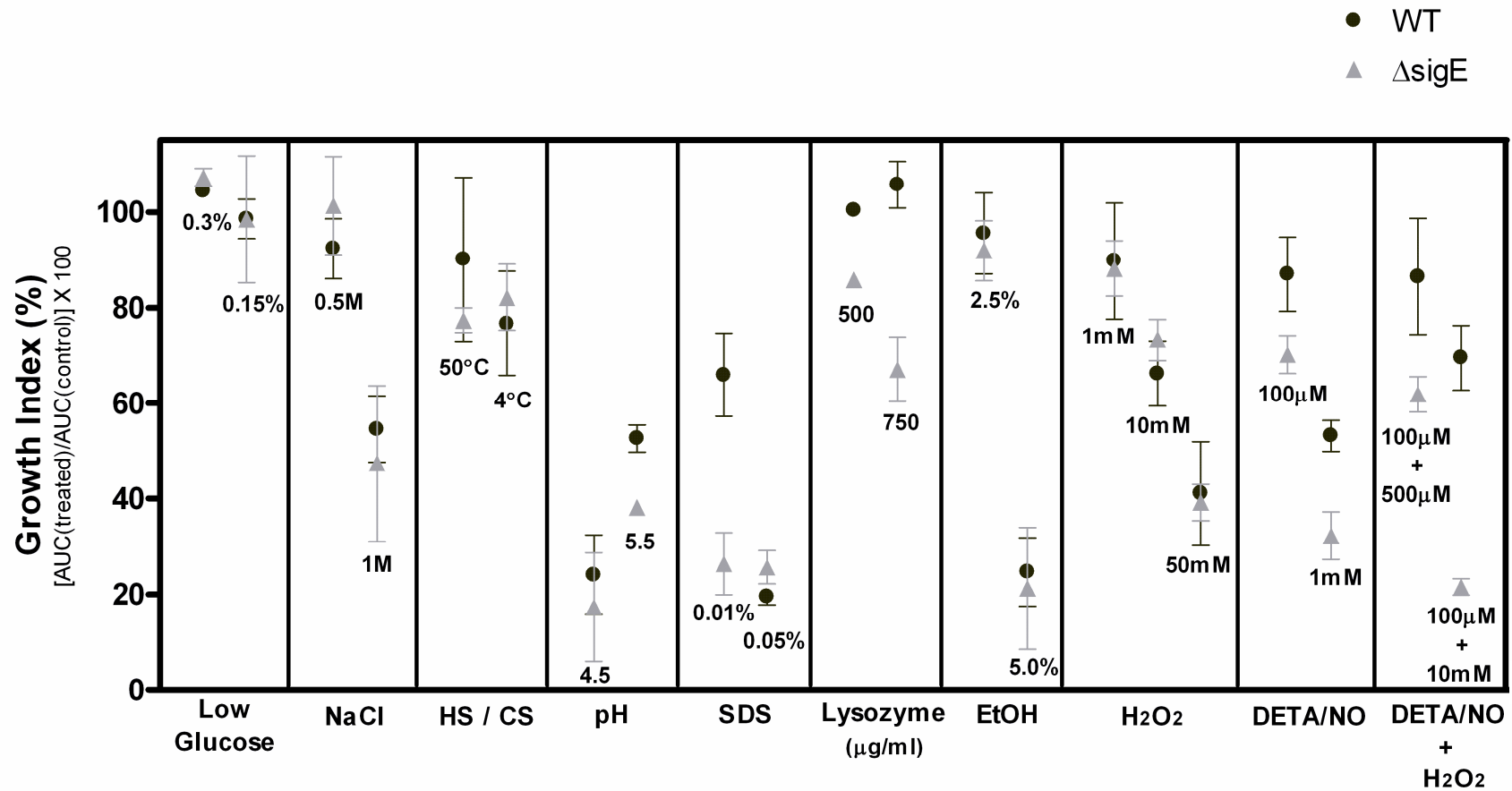


Figura 6.9. Resistência das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse *in vitro*. Culturas das duas linhagens em fase exponencial inicial ($DO_{540nm} = \sim 0.1$) foram submetidas aos diferentes agentes geradores de estresse e o crescimento das bactérias foi então monitorado por 24 horas. O resultados apresentados (índices de crescimento) correspondem à relação percentual entre a área sob a curva de crescimento (AUC) de uma determinada linhagem (wt ou mutante) tratada com agente de estresse e a AUC da mesma linhagem não tratada (controle) (veja item 4.7). Valores médios e desvios-padrão foram calculados a partir de pelo menos cinco réplicas experimentais. As concentrações de 100 μM e 1 mM de DETA/NO geram *ca.* 500 nM e 5.000 nM de óxido nítrico (NO) em cultura, respectivamente. HS – *heat shock*; CS – *cold shock*.

Interessantemente, a linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* foi mais sensível que a linhagem tipo-selvagem 1002wt ao estresse gerado por concentrações baixas (~500 nM) e altas (~5.000 nM) de NO (Fig.6.9). Já foi demonstrado por outros grupos que concentrações baixas de NO *in vitro*, similares às utilizadas no presente estudo, são capazes de induzir uma resposta transcricional característica do estresse nitrosativo na bactéria *M. tuberculosis*; esta resposta se sobrepõe em parte com o reguloma de dormência desta bactéria, e leva à ativação dos fatores sigmas ECF sigE e sigH (Ohno et al., 2003; Voskuil et al., 2003; Schnappinger et al., 2003). Além disso, diferentes trabalhos mostraram que a transcrição do gene *sigE* é aumentada em *M. tuberculosis* durante a infecção intracelular (Schnappinger et al. 2003; Talaat et al., 2004; Fontán et al., 2008); mais importante, os resultados sugerem que os genes regulados pelo fator sigE podem conferir à bactéria *M. tuberculosis* a habilidade de evitar as respostas adaptativas da célula hospedeira (Fontán et al., 2008) No entanto, apesar das evidências de que o fator sigE pode participar de forma significativa da resposta específica ao estresse gerado por NO, a contribuição deste fator para a resistência bacteriana a este agente aparentemente ainda não tinha sido avaliada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para nenhum organismo até o presente estudo.

Como o estresse nitrosativo *in vivo* é exacerbado pela combinação do agente NO com espécies reativas de oxigênio, *e.g.* na formação do agente peroxinitrito (ONOO⁻) (Nathan & Shiloh, 2000; Ogawa et al., 2001; Omsland et al., 2008), nós decidimos avaliar também o efeito exercido pela combinação de NO com concentrações sub-letais de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento da linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis*. A Figura 6.9 mostra que a linhagem 1002($\Delta sigE$) foi extremamente mais sensível à combinação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, comparado à sensibilidade ao NO somente. Os resultados, como um todo, sugeriram que o fator sigE é sim essencial para a resistência de *C. pseudotuberculosis* ao estresse nitrosativo *in vitro*, e deve ser também necessário para a resistência a este tipo de estresse durante a infecção.

Como confirmação complementar, o efeito do tratamento com NO sobre as diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* também foi avaliado por análises de viabilidade celular, tanto por contagem de unidades formadoras de colônia (Fig.6.10A) quanto por análises de citometria de fluxo (Fig.6.10B).

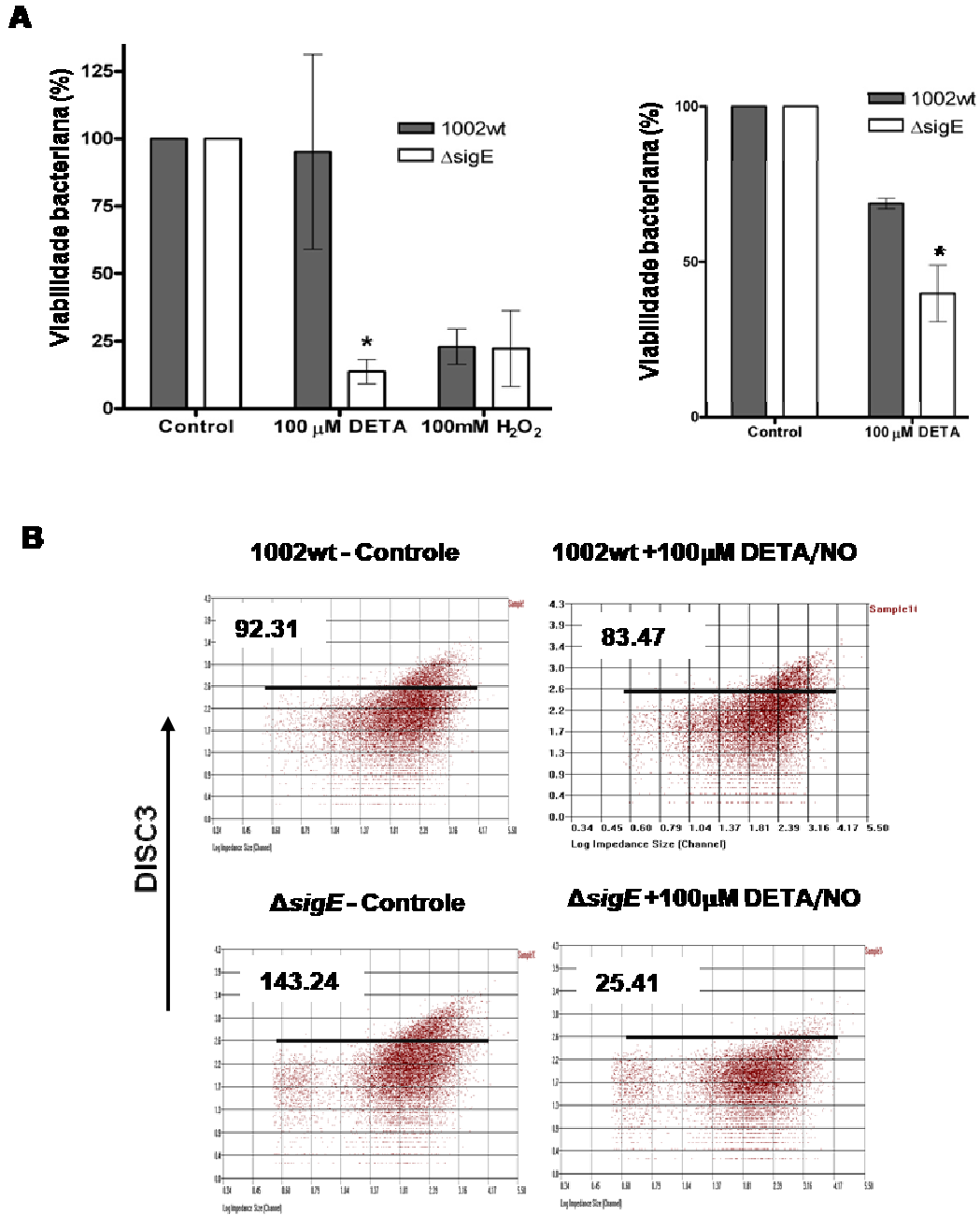


Figura 6.10. Análises de viabilidade das linhagens 1002wt e 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis* após exposição a agente gerador de estresse nitrosativo (DETA/NO). (A) As duas linhagens foram cultivadas até o início da fase exponencial, quando 100 μ M do agente doador de NO DETA/NO foram adicionados às culturas. Após 1 h de exposição à condição de estresse, diluições seriadas das diferentes linhagens foram plaqueadas em BHI ágar para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após 48 hrs. São apresentados resultados de dois experimentos distintos. (B) Após tratamento por 1h com o agente DETA/NO, as bactérias foram marcadas com as sondas fluorescentes SYTO62 (marcador de ácidos nucleicos) e DiSC₃ (marcador de viabilidade celular) (Breeuwer & Abee, 2004) e adquiridas num citômetro de fluxo do tipo CF II (CellFacts Instruments, Reino Unido). Os valores de fluorescência emitidos (unidades arbitrárias – eixo vertical) correspondem à viabilidade celular; valores médios estão incluídos nos dot plots. O eixo horizontal representa o tamanho das células. Uma linha foi incluída para ajudar na comparação das fluorescências emitidas pelas diferentes amostras.

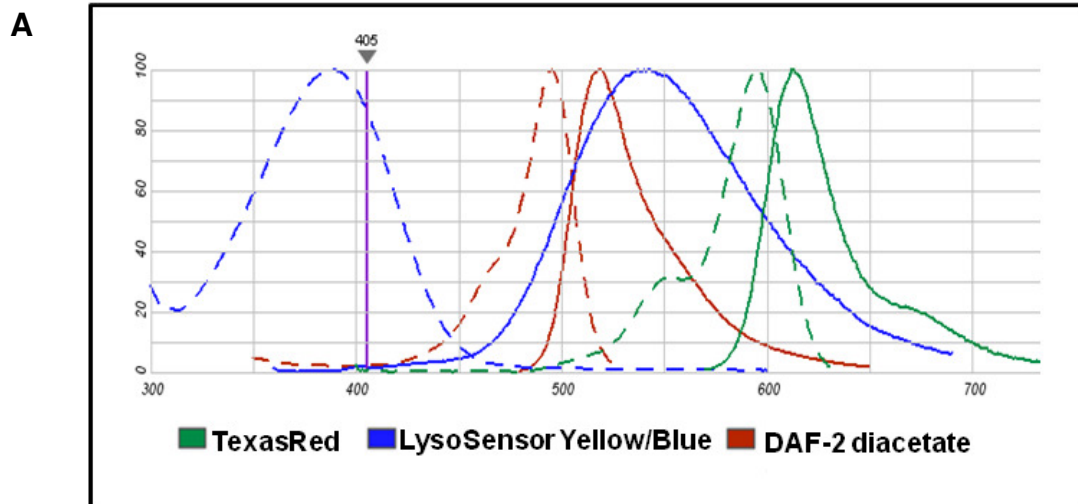
6.4 Avaliação do estresse nitrosativo sofrido pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* no ambiente intracelular

Uma questão essencial para entender a contribuição do fator sigE na resistência da bactéria *C. pseudotuberculosis* à vida intracelular é justamente confirmar como, e até mesmo se, esta bactéria encontra o agente NO durante seu ciclo infeccioso. Isto porque já foi demonstrado que a Actinobactéria patogênica *M. tuberculosis*, paradigma da infecção intracelular, possui mecanismos sofisticados para evitar tanto a fusão fagossomo-lisossomo quanto o contato com o NO produzido pela célula hospedeira no ambiente fagossômico onde ela reside (Davis et al., 2007; Warner & Mizrahi, 2007; Pieters, 2008).

Trabalhos de microscopia com células fagocíticas infectadas por *C. pseudotuberculosis*, realizados no início da década de 1980, sugeriam que esta bactéria não evita a fusão fagossomo-lisossomo, ao contrário do que acontece com *M. tuberculosis*. Esta questão não foi explorada com técnicas mais modernas desde então (Tashjian and Campbell, 1983). Como é de fundamental importância para o presente trabalho definir se *C. pseudotuberculosis* realmente sofre estresse causado por NO num ambiente fagossômico, decidimos implementar uma estratégia que nos permitisse visualizar a dinâmica da infecção intracelular por esta bactéria, bem como o processo de liberação de NO intracelular acontecendo.

Para isto, macrófagos RAW264.7 foram cultivados e infectados com as linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*, previamente marcadas com o reagente fluorescente TexasRed (Davis et al., 2007). As células fagocíticas foram também incubadas com reagentes fluorescentes, os quais permitem visualizar em tempo real compartimentos lisossômicos (LysoSensor Yellow-Blue) (Axelrod et al., 2008) e a liberação de NO (DAF-2) (Ye et al., 2008). Após 1 h de infecção por *C. pseudotuberculosis*, os macrófagos foram analisados por microscopia confocal; foi possível adquirir imagens dos três reagentes fluorescentes simultaneamente, devido a não sobreposição dos espectros de excitação e emissão das sondas escolhidas (Fig.6.11A).

Com esta estratégia foi possível confirmar que ambas as linhagens (wt e mutante) permanecem num compartimento aparentemente acidificado dentro dos macrófagos (provavelmente o fagolisossomo) após infecção, o qual co-localiza com as áreas de liberação de NO pelas células hospedeiras (Fig.6.11B).



B

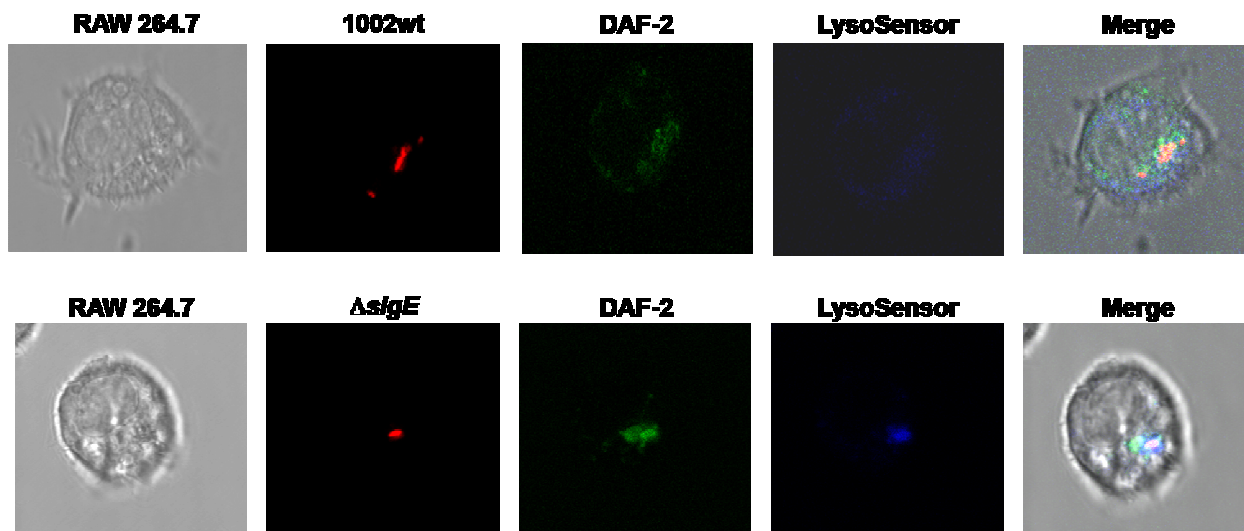


Figura 6.11. Avaliação do estresse nitrosativo sofrido pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* no ambiente intracelular. (A) Espectros de excitação (linhas pontilhadas) e emissão (linhas contínuas) de fluorescência dos reagentes TexasRed (marcação das bactérias vivas), LysoSensor Yellow-Blue (visualização de compartimento lisossômico acidificado) e DAF-2 (visualização de NO). Figura gerada com a ferramenta SpectraViewer (disponível em: <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer>) (B) Linhagens de macrófagos murinos RAW264.7 foram incubadas com os reagentes LysoSensor e DAF-2 e depois infectadas com as linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* (MOI 5:1), marcadas com TexasRed. Após 1 hora de infecção, as células foram visualizadas em um microscópio confocal Leica SP5.

6.5 Análises proteômicas comparativas dos exoproteomas das linhagens 1002wt e mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*, tratadas ou não com NO

Para testar a hipótese que o fator sigma ECF sigE contribui para a regulação do proteoma extracelular de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao estresse nitrosativo gerado por NO, a metodologia proteômica implementada neste trabalho para análise comparativa em larga escala de exoproteomas bacterianos (TPP/LC-MS^E) foi empregada (vide Capítulo 5). Basicamente, as linhagens tipo-selvagem (1002wt) e mutante ($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis* foram crescidas em meio quimicamente definido (MQD) até atingirem o mesmo ponto do crescimento exponencial ($DO_{540nm} = \sim 0.3$). Neste momento, as culturas foram divididas em duas, e 100 μM do agente DETA/NO foi adicionado a uma cultura de cada linhagem, as quais foram incubadas por mais 1 h a 37°C, juntamente com as culturas controle (não tratadas). Então, seguiram-se os protocolos de extração de proteínas exportadas (TPP) e de análise proteômica qualitativa e quantitativa em larga escala (LC-MS^E), como descrito anteriormente (Capítulo 5).

A Figura 6.12 faz uma compilação da performance técnica da metodologia combinada TPP/LC-MS^E após análise dos proteomas extracelulares dos 4 grupos experimentais: (i) 1002wt controle (não tratado); (ii) 1002wt + 100 μM DETA/NO; (iii) $\Delta sigE$ controle (não tratado); (iv) $\Delta sigE$ + 100 μM DETA/NO.

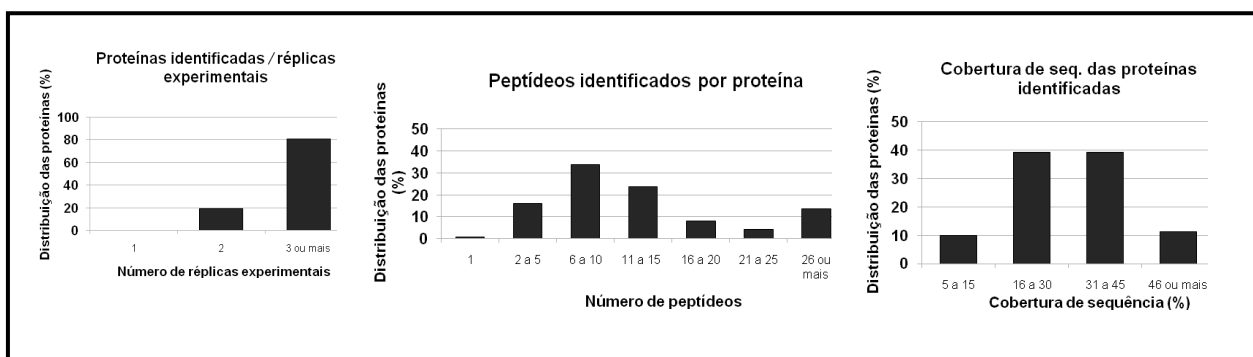


Figura 6.12. Desempenho da estratégia proteômica utilizada para análise comparativa dos exoproteomas das linhagens de *C. pseudotuberculosis*, tratadas ou não com NO. Os resultados mostrados referem-se a todo o conjunto de proteínas identificadas nos quatro grupos diferentes.

6.5.1 Alterações qualitativas dos proteomas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ em resposta ao NO

No total, 281 proteínas extracelulares foram identificadas pelo método LC-MS^E após análise dos 4 grupos experimentais: (i) 1002wt controle; (ii) 1002wt + DETA/NO; (iii) $\Delta sigE$ controle; (iv) $\Delta sigE$ + DETA/NO. Este conjunto representa 104 proteínas diferentes da bactéria *C. pseudotuberculosis*. Interessantemente, a análise de diferentes linhagens submetidas a condições de estresse nitrosativo aumentou ainda mais o catálogo de proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* identificadas neste trabalho (vide Capítulo 5). Isto provavelmente se deve à observação agora de proteínas extracelulares diferencialmente reguladas nesta bactéria, tanto devido às condições de estresse, quanto devido à falta do fator sigE funcional.

A Figura 6.13 mostra como as 104 exoproteínas diferentes se distribuíram pelos 4 proteomas extracelulares estudados.

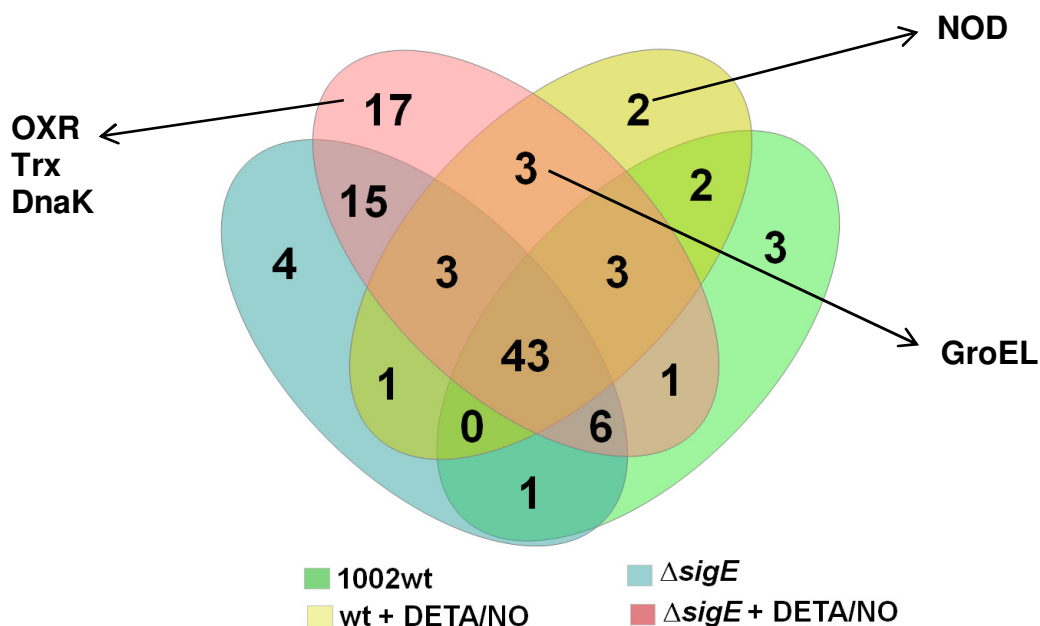


Figura 6.13. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* identificadas nos 4 grupos experimentais. As proteínas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$, tratadas ou não com 100 μ M DETA/NO, foram extraídas e identificadas pelo método TPP/LC-MS^E (Capítulo 5). 281 proteínas foram confiavelmente identificadas nos 4 grupos, representando 104 proteínas extracelulares diferentes de *C. pseudotuberculosis*. As setas destacam algumas proteínas exclusivas dos exoproteomas dos grupos tratados por NO.

Dentre as diferenças qualitativas mais marcantes entre os proteomas extracelulares dos diferentes grupos, destaca-se a identificação de uma provável proteína dioxigenase (NOD) exclusivamente no exoproteoma da linhagem 1002wt tratada com NO (Fig.6.13). Proteínas dioxigenases estão envolvidas com detoxificação de óxido nítrico em outras bactérias (Gardner et al., 1998; Mitsumoto et al., 1999), o que faz desta proteína uma boa candidata para explicar a maior resistência da linhagem 1002wt de *C. pseudotuberculosis* ao estresse nitrosativo. Estudos adicionais serão necessários para confirmar se a expressão desta proteína diferencial é realmente dependente do fator sigE e, principalmente, se esta proteína desempenha algum papel na detoxificação de NO extracelular.

Outra variação importante foi a identificação de um número bem maior de proteínas no exoproteoma da linhagem mutante $\Delta sigE$ tratada com NO, comparado a todos os outros grupos (Fig.6.13). Dentre as proteínas exclusivamente identificadas neste grupo ($\Delta sigE$ + DETA/NO), destacaram-se proteínas provavelmente ligadas a outras vias de resposta ao estresse, como enzimas oxidoredutases e chaperones (Raman et al., 2001). Isto pode ser um indicativo de uma via compensatória de resposta ao estresse desencadeada na linhagem mutante, devido à falta do fator sigE, mas esta possibilidade também permanece pra ser estudada em maiores detalhes.

6.5.2 Alterações quantitativas dos proteomas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ em resposta ao NO

A utilização da metodologia LC-MS^E para análise dos exoproteomas dos diferentes grupos experimentais permitiu que também fossem realizadas comparações quantitativas das proteínas identificadas (vide Capítulo 5 para detalhes sobre a quantificação de proteínas com esta técnica).

A Figura 6.14 resume os principais resultados das análises de expressão diferencial de proteínas entre os diferentes grupos. É interessante notar que praticamente não houve variação de expressão das proteínas que foram comuns aos grupos 1002wt (controle) e 1002wt tratado com NO (Fig. 6.14A). Este resultado é indicativo de que (i) a metodologia implementada no presente estudo para análise comparativa de exoproteomas

bacterianos tem muito boa reprodutibilidade e (ii) o estresse gerado por NO não leva a alterações significativas do proteoma extracelular na linhagem tipo-selvagem de *C. pseudotuberculosis*.

O resultado mais marcante das análises de expressão diferencial de proteínas extracelulares foi a observação de uma proteína anotada como ‘provável proteína secretada’ com superexpressão maior que 100 vezes na linhagem mutante $\Delta sigE$ tratada com NO, em comparação com a linhagem 1002wt também tratada (Fig. 6.14D). Análises bioinformáticas não permitiram a identificação de qualquer domínio conservado que pudessem auxiliar a predição de alguma função para esta proteína (dados não mostrados). No entanto, o nível de expressão na linhagem mutante $\Delta sigE$ é indicativo de que esta proteína desempenha alguma função essencial quando esta linhagem de *C. pseudotuberculosis* é exposta ao estresse nitrosativo.

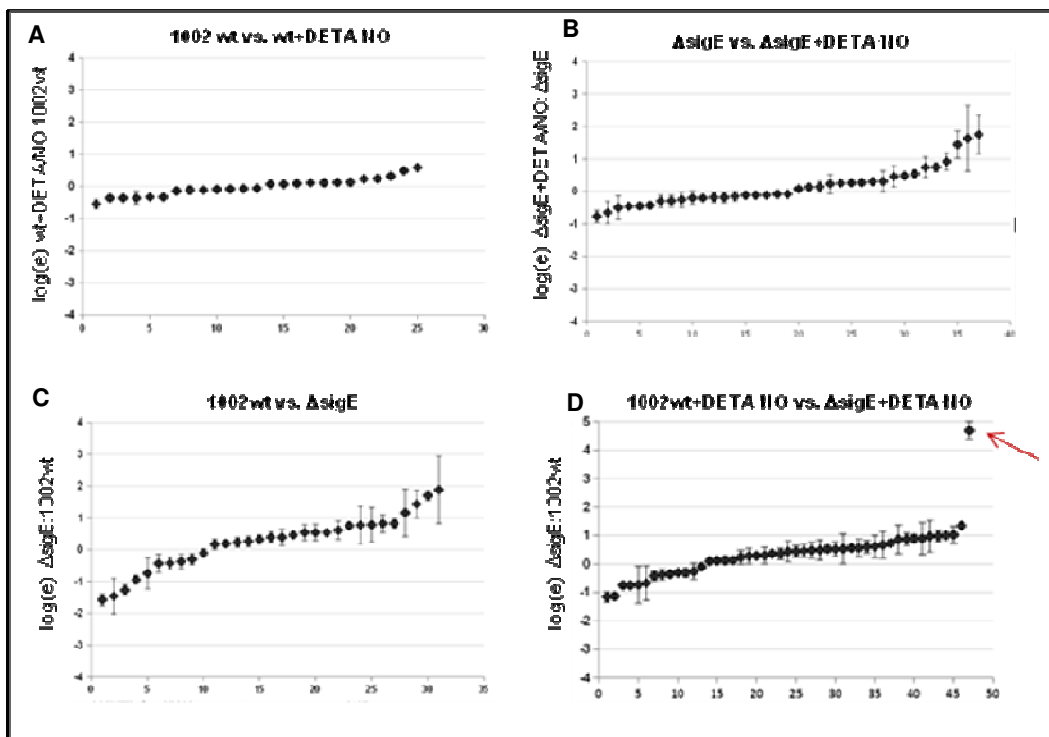


Figura 6.14. Expressão diferencial das proteínas extracelulares das linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao NO. As taxas de expressão relativa das proteínas extracelulares foram comparadas entre os grupos através da técnica de proteômica quantitativa *label-free* LC-MS^E (Capítulo 5). As listas de proteínas diferencialmente expressas, bem como as taxas de expressão, encontram-se no Anexo II. A seta indica uma ‘provável proteína secretada’, 108.8 vezes mais expressa na linhagem $\Delta sigE$ após tratamento com NO.

6.6 Avaliação do papel do fator sigE na virulência da bactéria *C. pseudotuberculosis*

6.6.1 Infecção de animais tipo-selvagem C57BL/6 e nocaute iNOS^{-/-} com as linhagens 1002wt e 1002(Δ sigE) de *C. pseudotuberculosis*

A disponibilidade de camundongos deficientes para a enzima óxido nítrico sintase indutível (nocautes iNOS^{-/-}) nos proporcionou uma boa oportunidade para avaliar o papel do fator sigE de *C. pseudotuberculosis* na resistência ao estresse nitrosativo *in vivo*. A enzima iNOS é a principal fonte do NO gerado pelas células fagocíticas em resposta à infecção intracelular. Esta enzima é capaz de gerar altas concentrações de NO num compartimento fagossômico através da via bioquímica de conversão de L-arginina em L-citrulina. A expressão de iNOS é regulada pela via de sinalização desencadeada pela citocina pró-inflamatória interferon-gama (IFN- γ), o que explica a alta produção de NO por macrófagos ativados (Nathan & Shiloh, 2000; Tsutsui et al., 2006)

No presente estudo, camundongos C57BL/6 e camundongos nocaute iNOS^{-/-} foram infectados pela via intraperitoneal com 10⁶ UFC da linhagem mutante Δ sigE ou da linhagem selvagem 1002(wt) de *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, a presença das bactérias nos baços e nos linfonodos dos animais infectados foi avaliada em intervalos de tempo determinados. Os dias 1 e 3 após a infecção foram escolhidos como os tempos ideais para avaliação da persistência da infecção pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Isto porque (i) a infecção pela linhagem mutante Δ sigE era rapidamente controlada pelos animais tipo-selvagem C57BL/6; (ii) a linhagem 1002wt mostrou uma tendência a formar abscessos localizados nos animais infectados em intervalos de tempo maiores que 5 dias, ao passo que menos bactérias eram contadas no baço dos animais nos intervalos maiores de tempo (dados não mostrados); e (iii) os animais iNOS^{-/-} mostraram-se muito susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis* 1002wt, apresentando extrema caquexia e vindo a óbito em menos de uma semana (dados não mostrados); isto nos levou também a optar por sacrificar estes animais no 3^o dia pós-infecção.

A figura 6.15A apresenta os resultados de persistência das linhagens 1002wt e Δ sigE de *C. pseudotuberculosis* nos baços de animais C57BL/6 infectados, 1 e 3 dias após a infecção. É possível notar que no primeiro dia de infecção a quantidade de

unidades formadoras de colônias (UFC) das duas linhagens no baço dos animais não é significativamente diferente (Fig.6.15A). Este resultado é corroborado pela observação de que as duas linhagens foram igualmente capazes de infectar macrófagos em cultura, demonstrando que a mutação do fator sigE provavelmente não afetou a capacidade de *C. pseudotuberculosis* de aderir e se internalizar em células fagocíticas (Fig. 6.15B).

Contudo, após 3 dias de experimento os animais C57BL/6 são capazes de controlar completamente a infecção pela bactéria mutante $\Delta sigE$, o que não acontece com a bactéria selvagem 1002wt, indicando atenuação da linhagem (Fig.6.15A). Interessantemente, a linhagem mutante $\Delta sigE$ persiste em camundongos $iNOS^{-/-}$ (Fig.6.15C) e é capaz de matar macrófagos não produtores de NO em cultura (Fig.6.15D), demonstrando então a importância do fator sigE de *C. pseudotuberculosis* na resistência ao agente NO durante a infecção.

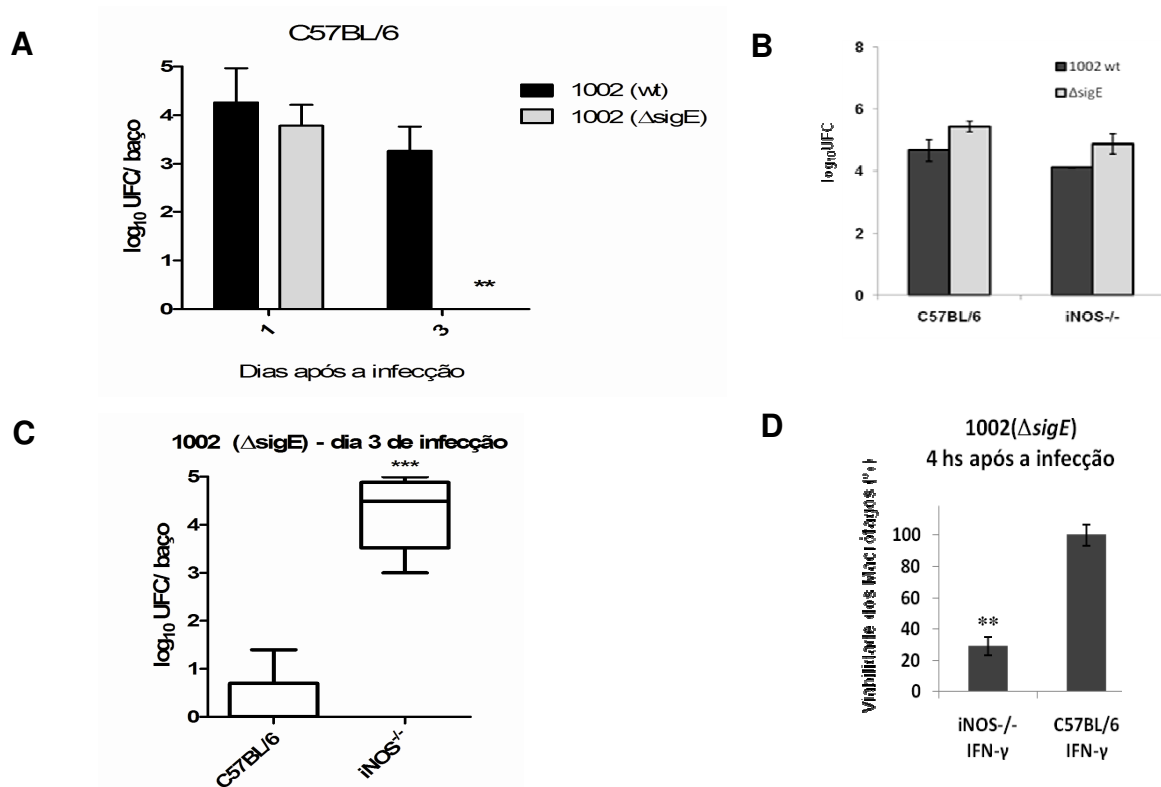


Figura 6.15. Infecção de camundongos C57BL/6 e $iNOS^{-/-}$, e de macrófagos em cultura com as linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*. (A) Persistência das duas linhagens em animais C57BL/6 infectados. (B) Fagocitose das linhagens de *C. pseudotuberculosis* por macrófagos em cultura após infecção com MOI5:1 (C) Persistência da linhagem mutante $\Delta sigE$ em animais C57BL/6 e $iNOS^{-/-}$, três dias após a infecção com 10^6 UFC. (D) Viabilidade de macrófagos C57BL/6 e $iNOS^{-/-}$, ativados ou não por IFN-gama, após infecção com a linhagem mutante $\Delta sigE$. ** teste-t $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

6.7 Tentativa de complementação da mutação do gene *sigE* na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis*

Inicialmente, uma análise *in silico* das regiões regulatórias do gene *sigE* foi realizada com diferentes ferramentas bioinformáticas (Fig.6.16). Foi possível identificar três possíveis elementos promotores deste gene, numa região de aproximadamente 1000 pb à montante do início da janela aberta de leitura (do inglês, *orf*) (Fig.6.16). Além disso, dois possíveis códons de iniciação foram detectados para o gene *sigE* (TTG e ATG), ambos na mesma fase de leitura (Fig.6.16). Estes resultados são altamente concordantes com o que foi descrito recentemente por Donà et al. (2008) para a regulação do gene *sigE* na bactéria *M. tuberculosis*. Este trabalho mostrou através de análises *in silico* e *in vitro* que o gene *sigE* pode ser transcrito à partir de três promotores diferentes, em resposta a diversas condições ambientais, tais como estresse oxidativo e estresse de superfície gerado por SDS (Donà et al., 2008). Além disso, a tradução do fator sigE pode começar a partir de diferentes códons de iniciação presentes no mRNA, incluindo o códon alternativo TTG (Donà et al., 2008).

A fim de tentar complementar a mutação do gene *sigE* na linhagem mutante 1002($\Delta sigE$) de *C. pseudotuberculosis*, dois novos plasmídeos foram construídos, pLP3 e pLP5, levando-se em conta as análises de possíveis regiões promotoras (Fig.6.17; Anexo II).

Ambos plasmídeos foram baseados em vetores previamente desenvolvidos para a bactéria *Corynebacterium glutamicum*, os quais também são funcionais em *Escherichia coli* (Kirchner & Tauch, 2003). O plasmídeo pLP3 objetiva a complementação de σ^E pela expressão deste fator em *C. pseudotuberculosis* a partir das seqüências promotoras naturais clonadas. Já o plasmídeo pLP5 carrega somente a *ORF* codificadora do fator σ^E , desta vez sob o controle de um promotor induzido por isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) (Fig.6.17A e B).

Após eletroporação na linhagem mutante 1002($\Delta sigE$), os dois plasmídeos levaram a um aumento significativo da fase *lag* do crescimento das novas linhagens transformantes (dados não mostrados). Isto provavelmente aconteceu devido ao (i) efeito bacteriostático natural do antibiótico cloranfenicol e (ii) grande tamanho dos dois novos plasmídeos construídos.

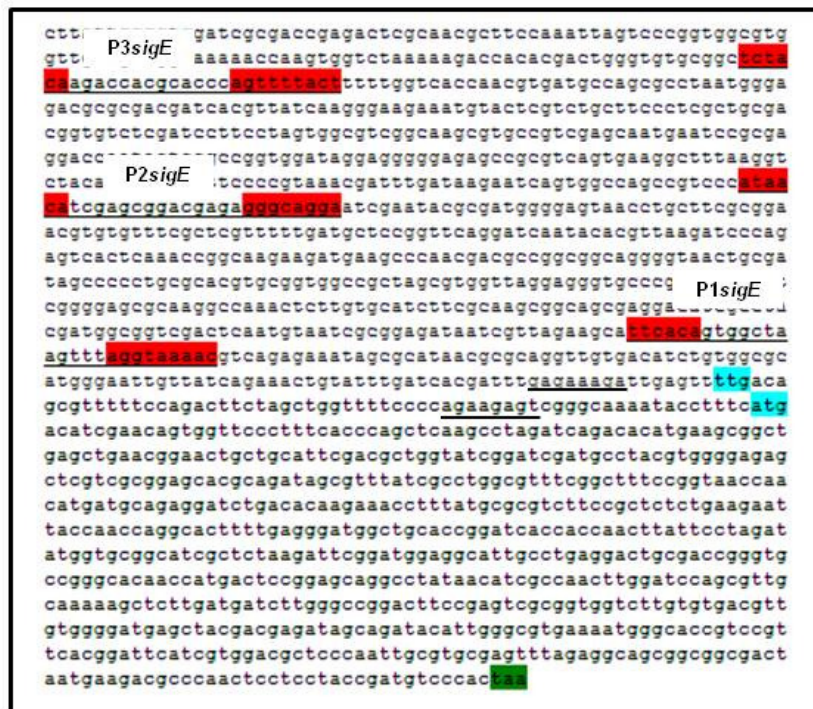


Figura 6.16. Análise de regiões promotoras do gene sigE de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A sequência codificadora do fator sigE, acrescida de 1000 nucleotídeos à montante do início da ORF, foi submetida a análise de promotores utilizando diferentes ferramentas bioinformáticas, quais sejam: (i) *SoftBerry*, (ii) *Prokaryotic Promoter Prediction (PPP) tool* e (iii) *Prokaryotic promoter analysis using SAK* (todas acessíveis através do endereço: <http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>). Possíveis seqüências promotoras, identificadas por pelo menos duas ferramentas bioinformáticas, estão sublinhadas; as prováveis regiões -35 e -10 estão marcadas em vermelho. Os prováveis códons de iniciação estão marcados em azul, e o códon de terminação está marcado em verde. Possíveis sítios de ligação do ribossomo (do inglês, RBS) também estão sublinhados.

6.7.1 Análise de expressão da proteína sigE nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* transformadas com o plasmídeo pLP5

As linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ foram transformadas com o plasmídeo pLP5 (Fig.6.17B) e a expressão do fator sigE, sob o controle do promotor *P_{trc}*, foi induzida pela adição de IPTG. No entanto, não foi obtida expressão visivelmente detectável desta proteína (em torno de 25.8 kDa) em nenhuma das linhagens, induzidas com diferentes concentrações de IPTG durante a fase exponencial de crescimento (Fig.6.18A e B). Novos experimentos, dessa vez utilizando análises de *Western blot*, são necessários para confirmar se realmente não é possível obter expressão do fator sigE a partir do plasmídeo pLP5.

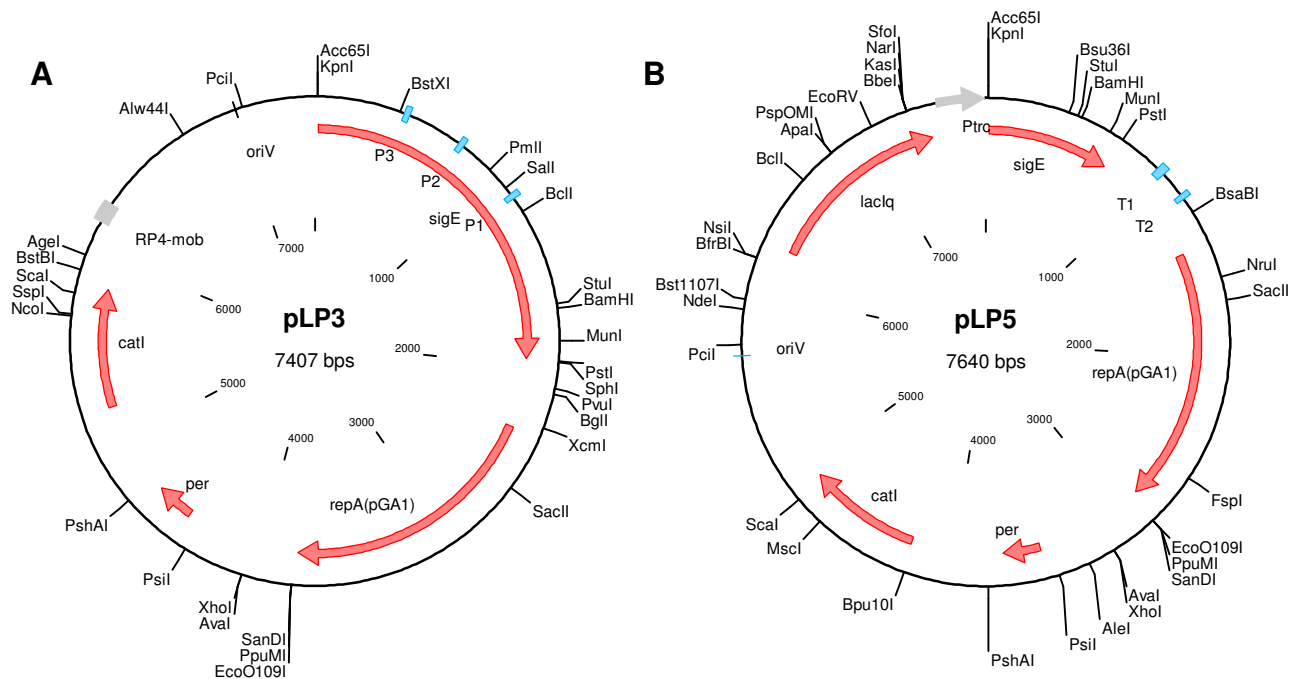


Figura 6.17. Plasmídeos para complementação (pLP3) e super-expressão (pLP5) do fator sigE. (A) A região contendo os três promotores preditos do gene *sigE*, além da ORF, foi clonada no vetor replicativo pEC-C18mob2, entre os sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *PstI*, para gerar o plasmídeo pLP3. As posições de cada um dos promotores preditos estão indicadas em azul. *catI*, gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. (B) A região correspondente à ORF do fator *sigE*, iniciando-se no códon TTG, foi clonada em fase com o promotor indutível *Ptrc* no vetor de expressão PEC-XC99E, para gerar o plasmídeo pLP5. *catI*, gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; *lacI^q*, gene codificador do repressor Lac.

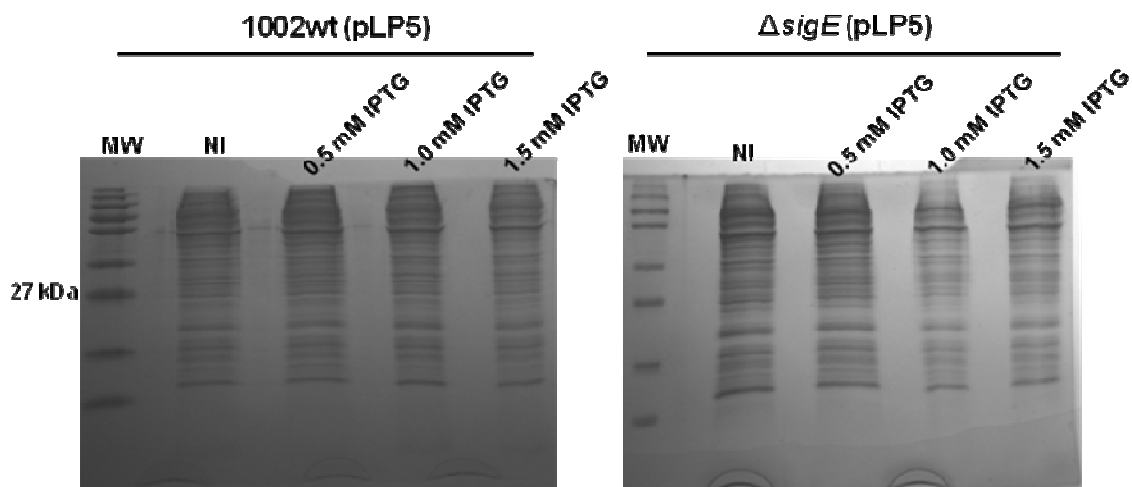


Figura 6.18. Análise de expressão do fator sigE a partir do plasmídeo pLP5. As linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pLP5 e a expressão do fator *sigE* foi induzida pela adição de diferentes concentrações de IPTG. As proteínas totais de cada linhagem foram extraídas por sonicação e 12 μ g de cada extrato foram resolvidos por 12% SDS-PAGE e visualizados por coloração com Comassie coloidal. MW – PageRuler Pre-Stained (Fermentas). NI – controle não induzido.

6.8 Modelo esquemático baseado nos resultados deste estudo com o fator sigma ECF sigE de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A Figura 6.19 apresenta uma compilação esquemática dos principais resultados obtidos no presente estudo. Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, foi possível confirmar que o fator sigma alternativo ECF sigE de *C. pseudotuberculosis* desempenha um papel essencial na resistência desta bactéria a condições de estresse encontradas no ambiente intrafagossômico durante a infecção. Em particular, foi observada a participação deste fator na resistência ao agente gerador de estresse nitrosativo óxido nítrico (NO), o qual aparentemente tem papel destacado no controle da infecção por *C. pseudotuberculosis*. Além disso, foi possível sugerir que o fator sigE pode participar da resposta ao estresse extracitoplasmático através da regulação de proteínas componentes do exoproteoma.

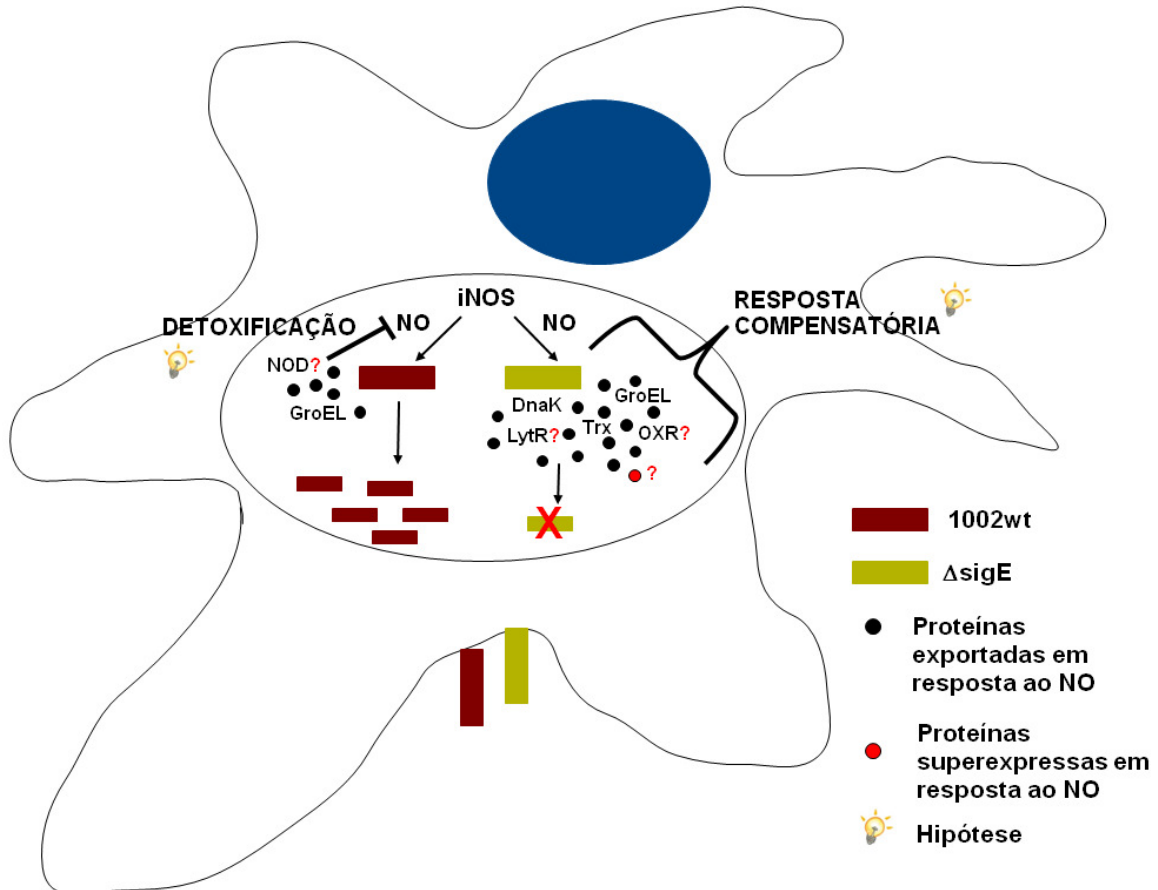


Figura 6.19. Representação esquemática da participação do fator sigE de *C. pseudotuberculosis* na resistência ao estresse nitrosativo intracelular. Proteínas anotadas no Genoma de *C. pseudotuberculosis* como “putativas” ou “hipotéticas” são representadas com um sinal de interrogação para indicar que não existe evidência experimental de funcionalidade. NOD = provável dioxigenase de óxido nítrico; OXR = provável oxidoreductase; Trx = tioredoxina; LytR = provável regulador transcricional; GroEL e DnaK = proteínas chaperone; NO = óxido nítrico; iNOS = NO sintase indutível.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo fortemente corroboram a hipótese de que o fator sigma de função extracitoplasmática sigE desempenha papéis na regulação do proteoma extracelular da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e na resistência deste patógeno a diferentes condições de estresse encontradas durante o processo de infecção intracelular. Especificamente, as seguintes conclusões podem ser tiradas dos resultados experimentais deste trabalho:

- 1- Foi possível realizar a mais completa caracterização do exoproteoma de uma bactéria do gênero *Corynebacterium* até o momento, utilizando a estratégia TPP/LC-MS^E.
- 2- A análise do exoproteoma de diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* permitiu a identificação de novas proteínas exportadas que provavelmente contribuem para a virulência desta bactéria.
- 3- A mutação do gene *sigE* de *C. pseudotuberculosis* afetou a resistência desta bactéria a condições de estresse de superfície celular, estresse ácido e estresse nitrosativo gerado por óxido nítrico e outras RNS *in vitro*.
- 4- Foram observadas significativas alterações qualitativas e quantitativas do exoproteoma de uma linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*, em comparação à linhagem selvagem 1002wt crescida sob condições normais ou submetida ao estresse nitrosativo.
- 5- A deficiência do fator sigE levou à reduzida virulência de uma linhagem mutante da bactéria *C. pseudotuberculosis*, provavelmente devido à diminuída resistência ao estresse nitrosativo *in vivo*.

7.2. Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para novos estudos com a bactéria *C. pseudotuberculosis*, incluindo:

- 1- Realizar análise do exoproteoma de novas linhagens de *C. pseudotuberculosis* com a estratégia TPP/LC-MS^E, a fim de confirmar a relação das proteínas variantes identificadas com os diferentes fenótipos de virulência, além de avaliar a contribuição da secreção não-clássica para a formação do proteoma extracelular desta bactéria.
- 2- Avaliar a contribuição das proteínas diferencialmente identificadas nos exoproteomas das linhagens de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao óxido nítrico para a detoxificação deste agente de estresse por esta bactéria.
- 3- Confirmar o papel do fator sigE na regulação das proteínas diferencialmente expressas nas linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*.
- 4- Realizar as análises de complementação do fator sigE na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Alves, F., Pinheiro, R. Linfadenite caseosa – Recomendações e medidas profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura. 1997 (ano100) Disponível em: <<http://www.snagricultura.org.br/artigos/artitec-caprino.htm>>

Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J.R., Boisclair, J., Simard, C., Bélanger, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.* 59: 67-81, 2003.

Axelrod, S., Oschkinat, H., Enders, J., Schlegel, B., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H.E., Haas, A., Schaible, U.E. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell. Microbiol.* 10: 1530-1545, 2008.

Baird, G.J., Fontaine, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137: 179-210, 2007.

Barinov, A., Loux, V., Hammani, A., Nicolas, P., Langella, P., Ehrlich, D., Maguin, E., van de Guchte, M. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics* 9: 61-73, 2009.

Bashyam, M.D., Hasnain, S.E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect. Genet. Evol.* 4: 301-308, 2004.

Bendtsen, J.D., Kierner, L., Fausbøll, A., Brunak, S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5: 58, 2005a.

Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., Brunak, S. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6: 167, 2005b.

Billington, S.J., Esmay, P.A., Songer, J.G., Jost, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 41-45, 2002.

Breeuwer, P., Abee, T. Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. In *Molecular microbial ecology manual, second edition*. . Kluwer Academic Publishers:2004. 1563–1580.

Brooks, B.E., Buchanan, S.K. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1930-1945, 2008.

Calamita, H., Ko, C., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Morrison, N.E., Bishai, W.R. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-

associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. *Cell. Microbiol.* 7: 233-244, 2005.

Carne, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Pathol. Bacteriol.* 51: 199-212, 1940.

Castro, T. Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo. . Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

Charlet, D., Mostowy, S., Alexander, D., Sit, L., Wiker, H.G., Behr, M.A. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. *Mol. Microbiol.* 56: 1302-1313, 2005.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 16: 388-396, 2008.

D'Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Moraes, P.M., Pena, I., Ortega, J.M., Teixeira, S., Oliveira, S.C., Coser, E.M., Oliveira, L.M., Corrêa de Oliveira, G., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiol. Res.* : , 2009.

Davis, A.S., Vergne, I., Master, S.S., Kyei, G.B., Chua, J., Deretic, V. Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS Pathog.* 3: e186, 2007.

Dennison, C., Lovrien, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr. Purif.* 11: 149-161, 1997.

Donà, V., Rodrigue, S., Dainese, E., Palù, G., Gaudreau, L., Manganelli, R., Provvedi, R. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190: 5963-5971, 2008.

Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201-218, 2006a.

Dorella, F.A., Estevam, E.M., Pacheco, L.G.C., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Gomes, E.A., Barsante, M.M., Oliveira, S.C., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7368-7372, 2006b.

Dorella, F.A., Estevam, E.M., Cardoso, P.G., Savassi, B.M., Oliveira, S.C., Azevedo, V., Miyoshi, A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 114: 298-303, 2006c.

Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Seyffert, N., Portela, R.W., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 8: 205-213, 2009.

Dumas, E., Desvaux, M., Chambon, C., Hébraud, M. Insight into the core and variant exoproteomes of *Listeria monocytogenes* species by comparative subproteomic analysis. *Proteomics* 9: 3136-3155, 2009.

Faria, G.A., Morais, O.R., Guimarães, P.H.S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [online]. <www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf>. 2004

Feelisch, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358: 113-122, 1998.

Fontán, P.A., Aris, V., Alvarez, M.E., Ghanny, S., Cheng, J., Soteropoulos, P., Trevani, A., Pine, R., Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor E regulon modulates the host inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 198: 877-885, 2008.

Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Uhlin, B.E., Steinert, M. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 76: 1825-1836, 2008.

Gao, L., Laval, F., Lawson, E.H., Groger, R.K., Woodruff, A., Morisaki, J.H., Cox, J.S., Daffe, M., Brown, E.J. Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49: 1547-1563, 2003.

Gardner, P.R., Costantino, G., Salzman, A.L. Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J. Biol. Chem.* 273: 26528-26533, 1998.

Geromanos, S.J., Vissers, J.P.C., Silva, J.C., Dorschel, C.A., Li, G., Gorenstein, M.V., Bateman, R.H., Langridge, J.I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* 9: 1683-1695, 2009.

Gomes, M.S., Appelberg, R. NRAMP1- or cytokine-induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. *Microbiology* 148: 3155-3160, 2002.

Hansmeier, N., Chao, T., Daschkey, S., Müsken, M., Kalinowski, J., Pühler, A., Tauch, A. A comprehensive proteome map of the lipid-requiring nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411. *Proteomics* 7: 1076-1096, 2007.

Hayden, J.D., Ades, S.E. The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One* 3: e1573, 2008.

Helmann, J.D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46: 47-110, 2002.

Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., Hecker, M. Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190: 4997-5008, 2008.

Hodgson, A.L., Krywult, J., Corner, L.A., Rothel, J.S., Radford, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.* 60: 2900-2905, 1992.

Jordan, S., Hutchings, M.I., Mascher, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 107-146, 2008.

Kaushal, D., Schroeder, B.G., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Scott, C., Ko, C., Carpenter, L., Mehrotra, J., Manabe, Y.C., Fleischmann, R.D., Bishai, W.R. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8330-8335, 2002.

Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 527-543, 2005.

Kim TH, Kim HJ, Park JS, Kim Y, Kim P, Lee HS. Functional analysis of sigH expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 17;331(4):1542-7, 2005.

Kirchner, O., Tauch, A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 104(1-3):287-99, 2003.

Krebs, J., Goldstein, E., Kilpatrick, S. Bacterial Transcription. In *Lewin's essential genes, 2nd ed.* Krebs, J.; Goldstein, E.S.; Kilpatrick, S.T. Jones and Barlett:2010. 264-293.

Kuria, J.K., Mbuthia, P.G., Kang'ethe, E.K., Wahome, R.G. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res. Commun.* 25: 89-97, 2001.

Målen, H., Berven, F.S., Fladmark, K.E., Wiker, H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 7: 1702-1718, 2007.

Malinski, T., Taha, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358: 676-678, 1992.

Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F.R., Smith, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 31: 715-724, 1999.

Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., Smith, I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol. Microbiol.* 41: 423-437, 2001.

Manganelli, R., Provvedi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., Smith, I. Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 186: 895-902, 2004.

Mascher, T., Hachmann, A., Helmann, J.D. Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J. Bacteriol.* 189: 6919-6927, 2007.

Master, S.S., Springer, B., Sander, P., Boettger, E.C., Deretic, V., Timmins, G.S. Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* 148: 3139-3144, 2002.

McKean, S., Davies, J., Moore, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect.* 7: 1352-1363, 2005.

McKean, S.C., Davies, J.K., Moore, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* 153: 2203-2211, 2007a.

McKean, S.C., Davies, J.K., Moore, R.J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees C. *Res. Microbiol.* 158: 279-286, 2007b.

McNamara, P.J., Bradley, G.A., Songer, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12: 921-930, 1994.

Mehra, S., Kaushal, D. Functional genomics reveals extended roles of the *Mycobacterium tuberculosis* stress response factor sigmaH. *J. Bacteriol.* 191: 3965-3980, 2009.

Meyer, R., Carminati, R., Bahia, R., Vale, V., Viegas, S., Martinez, T., Nascimento, I., Schaer, R., Silva, J., Ribeiro, M., Regis, L., Paule, B., Freire, S. Evaluation of the goats humoral immune response induced by the *Corynebacterium pseudotuberculosis* lyophilized live vaccine.. *J. Med. Biol. Sci.* 1: 42-48, 2002.

Mitsumoto, A., Kim, K.R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y. Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein. *Biochem. J.* 344 Pt 3: 837-844, 1999.

Miyoshi, A., Poquet, I., Azevedo, V., Commissaire, J., Bermudez-Humaran, L., Domakova, E., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Gruss, A., Langella, P. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3141-3146, 2002.

Moura-Costa L. F., Paule B. J. A., Azevedo, V., Freire S. M., Nascimento, I., Schaer, R., Regis, L.F., Vale, V.L.C., Matos, D.P., Bahia, R.C., Carminati, R., Meyer, R. Chemically defined synthetic medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture. *Rev. Bras. Saúde e Produção Animal* 3: 1-9, 2002.

Muller, C., Bang, I., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J., Fang, F.C. Acid stress activation of the sigma(E) stress response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 71: 1228-1238, 2009.

Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A.T., Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J. The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J. Bacteriol.* 189: 4696-4707, 2007.

Nathan, C., Shiloh, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8841-8848, 2000.

O'Brien, L.M.; Gordon, S.V.; Roberts, I.S.; Andrew, P.W. Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiology Letters*, 139:11-17, 1996.

Ogawa, R., Pacelli, R., Espey, M.G., Miranda, K.M., Friedman, N., Kim, S.M., Cox, G., Mitchell, J.B., Wink, D.A., Russo, A. Comparison of control of *Listeria* by nitric oxide redox chemistry from murine macrophages and NO donors: insights into listericidal activity of oxidative and nitrosative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 268-276, 2001.

Ohno, H., Zhu, G., Mohan, V.P., Chu, D., Kohno, S., Jacobs, W.R.J., Chan, J. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 5: 637-648, 2003.

Omsland, A., Miranda, K.M., Friedman, R.L., Boitano, S. *Bordetella bronchiseptica* responses to physiological reactive nitrogen and oxygen stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 284: 92-101, 2008.

Pacheco, L.G.C., Pena, R.R., Castro, T.L.P., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Carminati, R., Frota, M.N.L., Oliveira, S.C., Meyer, R., Alves, F.S.F., Miyoshi, A., Azevedo, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 56: 480-486, 2007.

Panchaud, A., Affolter, M., Moreillon, P., Kussmann, M. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics* 71: 19-33, 2008.

Park, S., Youn, J., Kim, Y., Lee, S., Kim, Y., Lee, H. *Corynebacterium glutamicum* sigmaE is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. *Microbiology* 154: 915-923, 2008.

Patel, V.J., Thalassinou, K., Slade, S.E., Connolly, J.B., Crombie, A., Murrell, J.C., Scrivens, J.H. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J. Proteome Res.* 8: 3752-3759, 2009.

Paton, M.W., S. B. Walker, I. R. Rose, G. F. Watt G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flock. *Aust. Vet. J.* 81: 91-95, 2003.

Paule, B.J.A., Meyer, R., Moura-Costa, L.F., Bahia, R.C., Carminati, R., Regis, L.F., Vale, V.L.C., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Azevedo, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 34: 311-316, 2004.

Pepin, M., Paton, M., Hodgson, A.L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Veterinary Research*, 1, 63-82, 1994.

Pieters, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 3: 399-407, 2008.

Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* 32(1):38-55, 2008.

Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W.R.J., Husson, R.N. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 183: 6119-6125, 2001.

Ribeiro, OC, Silva, JAH, Oliveira, SC, Meyer, R, Fernandes, GB Preliminary results on a living vaccine against caseous lymphadenitis. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 26: 461-465, 1991.

Richardson, A.R., Soliven, K.C., Castor, M.E., Barnes, P.D., Libby, S.J., Fang, F.C. The Base Excision Repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. *PLoS Pathog.* 5: e1000451, 2009.

Roe, M.R., Griffin, T.J. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics* 6: 4678-4687, 2006.

Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol Rev.* 219:37-54, 2007.

Said-Salim B, Mostowy S, Kristof AS, Behr MA. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol.* 62(5):1251-63, 2006.

Schaible, U. *Mycobacterium tuberculosis* and His Comrades. In *Intracellular niches of microbes*. Schaible, U.E., Haas, A.. Wiley-Blackwell:2009. .

Sambrook, J.; Russell, D. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ed. Cold Spring Harbor :CSHL Press, 2001.

Schafer, A; Tauch, A.; Jager, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G.; Puhler, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145:69-73, 1994.

Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C., Schoolnik, G.K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J. Exp. Med.* 198: 693-704, 2003.

Seyffert, N., Guimarães, A.S., Pacheco, L.G.C., Portela, R.W., Bastos, B.L., Dorella, F.A., Heinemann, M.B., Lage, A.P., Gouveia, A.M.G., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Res. Vet. Sci.* 88: 50-55, 2010.

Sibbald, M.J.J.B, and van Dij J. M.I Secretome Mapping in Gram-Positive Pathogens. In *Bacterial secreted protein: secretory mechanisms and role in pathogenesis*. Karl Wooldridge . Caister Academic Press:2009. 193-225.

Silva, J.C., Denny, R., Dorschel, C.A., Gorenstein, M., Kass, I.J., Li, G., McKenna, T., Nold, M.J., Richardson, K., Young, P., Geromanos, S. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal. Chem.* 77: 2187-2200, 2005.

Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G., Vissers, J.P.C., Geromanos, S.J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell Proteomics* 5: 144-156, 2006.

Simmons, C.P., Dunstan, S.J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, A.L., Strugnell, R.A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66: 474-479, 1998.

Simpson, R. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual. . Cold Spring Harbor: CSHL Press, 2003.

Songer, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5: 156-160, 1997.

Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.* 74: 557-581, 2009.

Stavriniades, J., McCann, H.C., Guttman, D.S. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell. Microbiol.* 10: 285-292, 2008.

Suzuki, N., Watanabe, K., Okibe, N., Tsuchida, Y., Inui, M., Yukawa, H. Identification of new secreted proteins and secretion of heterologous amylase by *C. glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 491-500, 2009.

Talaat, A.M., Lyons, R., Howard, S.T., Johnston, S.A. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 4602-4607, 2004.

Tashjian, J. J., S. G. Campbell. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.* 44: 690-693, 1983.

Testerman, T.L., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Libby, S.J., Fang, F.C. The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol. Microbiol.* 43: 771-782, 2002.

Tsutsui, M., Shimokawa, H., Morishita, T., Nakashima, Y., Yanagihara, N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J. Pharmacol. Sci.* 102: 147-154, 2006.

Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res.* 38: D401-7, 2010.

Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 198: 705-713, 2003.

Warner, D.F., Mizrahi, V. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 13: 282-284, 2007.

Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., Liew, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408-411, 1995.

Williamson, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 17:359-371, 2001.

Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S., et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001-1003, 1991.

Wood, L.F., Ohman, D.E. Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72: 183-201, 2009.

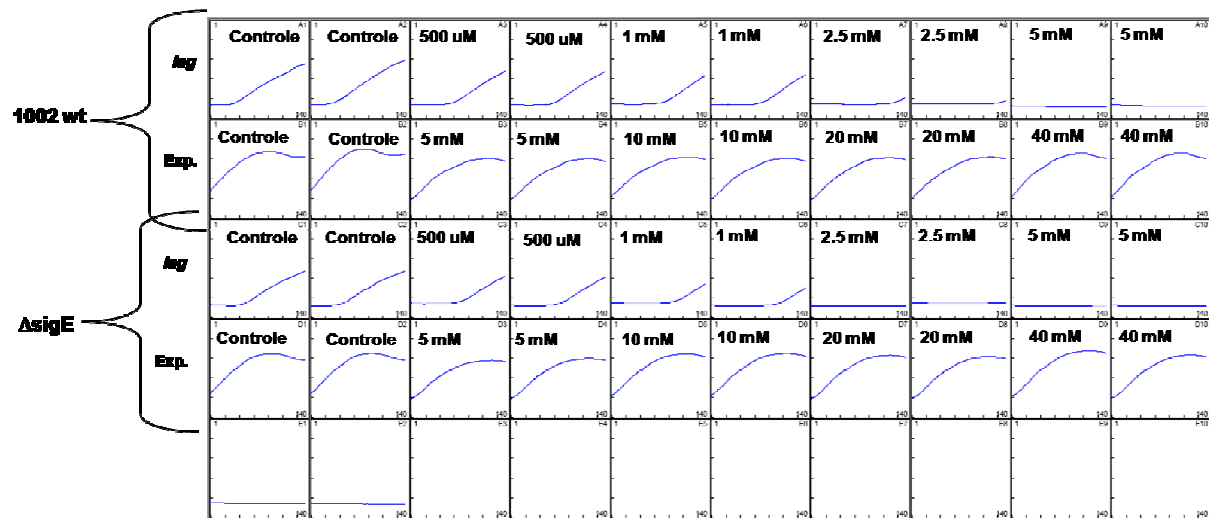
Ye, X., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V. Simultaneous nitric oxide and dehydroascorbic acid imaging by combining diaminofluoresceins and diaminorhodamines. *J. Neurosci. Methods* 168: 373-382, 2008.

9. ANEXOS

9.1 Anexo I – Resultados complementares

9.1.1 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* ao estresse oxidativo aplicado em diferentes fases do crescimento

9.1.2 Listas de proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens 1002wt e $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis*, tratadas ou não com NO



Curvas de crescimento das linhagens 1002wt e ΔsigE de *C. pseudotuberculosis* após adição de diferentes concentrações de agente gerador de estresse oxidativo (H₂O₂) a culturas em fase lag ou exponencial de crescimento.

Proteínas diferencialmente expressas entre os grupos 1002wt e Δ sigE

Description	Score	Unique	SIGE:WT_Ratio
Cp1002-SC1.006220 undefined product 673957:674439 reverse MW:17809	223.14	WT	WT
Cp1002-SC1.003970 Hypothetical protein 440741:442702 forward MW:70863	482.32	WT	WT
Cp1002-SC1.003360 Phosphoglyceromutase 378732:379505 forward MW:28710	104.99	WT	WT
Cp1002-SC1.001990 Putative zinc (Zn ²⁺) ABC superfamily ATP binding cassette transporter binding protein 218532:219524 forward MW:35635	210.04	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.003910 50S ribosomal protein L7/L12 434638:435021 forward MW:13287	221.92	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.005760 Transcriptional regulator 623541:625109 reverse MW:55053	258.57	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.003270 Putative secreted protein 367793:368641 reverse MW:29500	145.75	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.002870 putative iron transport system exported solute-binding component 313449:314522 forward MW:38352	283.89	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.012590 acyl-CoA synthase 1482930:1484777 reverse MW:66470	432.27	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.001200 Putative secreted penicillin-binding protein 137896:139356 reverse MW:50755	332.19	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.000300 Conserved integral membrane protein 30945:32846 reverse MW:65996	427.71	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.010100 Putative secreted protein 1184325:1185164 reverse MW:30509	164.37	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.007790 putative serine/threonine protein kinase 900358:902664 forward MW:81993	231.58	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.006860 Transcriptional regulator 739278:740519 reverse MW:43561	246.74	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.003020 Conserved hypothetical protein 333034:334848 forward MW:67249	226.81	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.005700 Putative metal-binding like protein 657041:657643 reverse MW:20810	432.85	SIGE	SIGE
Cp1002-SC1.000370 Putative surface-anchored membrane protein 44762:48169 reverse MW:122915	3721.48		0.66
Cp1002-SC2.011630 Putative trypsin-like serine protease 1354931:1356058 forward MW:41838	1356.42		5.47
Cp1002-SC2.008170 Hypothetical protein 948675:951008 reverse MW:85239	1168.01		0.9
Cp1002-SC2.008160 Putative membrane protein 947577:948476 reverse MW:31955	665.72		1.26
Cp1002-SC2.012640 Putative esterase 1490278:1491303 reverse MW:36582	292.35		0.48
Cp1002-SC1.001010 Conserved hypothetical protein 118232:118799 forward MW:19817	807.89		0.21
Cp1002-SC2.011170 Putative exported lipase 1298987:1300246 forward MW:44425	198.16		6.55
(P00489) Glycogen phosphorylase, muscle form OS=Oryctolagus cuniculus GN=PYGM PE=1 SV=3	1198.96		0.49
Cp1002-SC2.007870 NLPC_P60 protein 910645:911271 reverse MW:21410	106.69		1.72
Cp1002-SC1.004680 Putative pseudogene 508061:508870 forward MW:28905	231.53		1.19
Cp1002-SC1.004480 undefined product 488619:489581 forward MW:34575	209.44		3.19
Cp1002-SC2.012620 Putative esterase 1486515:1488449 reverse MW:70276	1592.84		1.21
Cp1002-SC1.005340 Putative secreted protein precursor 573426:574334 forward MW:32543	703.13		0.23
Cp1002-SC1.004670 Putative sialidase precursor 505812:507953 forward MW:77131	1535.05		0.39
Cp1002-SC1.006400 Putative secreted protein precursor 688895:689803 forward MW:32543	703.13		0.28
Cp1002-SC1.006360 putative membrane protein; heme transport associated protein 683845:685692 forward MW:63999	698.68		1.84
Cp1002-SC1.000480 Putative secreted protein 60254:60673 reverse MW:14558	487.17		0.74
Cp1002-SC2.001760 Hypothetical protein 191601:192308 reverse MW:24183	311.07		2.27
Cp1002-SC2.000930 resuscitation-promoting factor RpfB 101333:102484 forward MW:40221	1078.58		1.48
Cp1002-SC1.005300 putative membrane protein; heme transport associated protein 568377:570224 forward MW:63999	698.68		1.72
Cp1002-SC1.003170 surface layer protein A 356061:357140 reverse MW:38581	665.45		1.3
Cp1002-SC2.013170 hypothetical protein DIP0522 Putative membrane protein 1550809:1552809 reverse MW:72315	1637.44		1.72
Cp1002-SC2.011510 Putative pseudogene 1342986:1344475 reverse MW:54623	414.6		4.18

Cp1002-SC1.005850 Putative secreted protein 633274:634041 reverse MW:26706	89.1	2.18
Cp1002-SC2.013160 hypothetical protein DIP0523 Putative membrane protein 1549672:1550796 reverse MW:41272	1276.36	2.12
Cp1002-SC1.001500 Putative hydrolase 169502:170671 forward MW:41420	357.84	0.65
Cp1002-SC2.001730 Putative trypsin-like serine protease 189983:190723 reverse MW:25623	402.86	0.69
Cp1002-SC1.004570 Putative sugar-binding secreted protein 493963:495210 forward MW:43934	209.27	2.16
Cp1002-SC1.002120 Hypothetical protein 234902:235588 reverse MW:24266	265.43	2.27
Cp1002-SC2.012910 Hypothetical protein 1523954:1525954 reverse MW:72315	1637.44	1.58
Cp1002-SC2.000060 Putative trasnglycosylase 7005:7628 reverse MW:21422	259.51	1.38
Cp1002-SC2.012900 Hypothetical protein 1522817:1523941 reverse MW:41272	1276.36	1.48

Proteínas diferencialmente expressas entre os grupos 1002wt e 1002wt + DETA/NO

Description	Score	Unique	WT+DETA:WT_Ratio
Cp1002-SC2.011170 Putative exported lipase 1298987:1300246 forward MW:44425	198.16	WT	WT
Cp1002-SC2.006830 elongation factor Ts 783490:784389 reverse MW:32265	369.6	WT	WT
Cp1002-SC1.002100 Putative dioxygenase 231149:232039 forward MW:31483	180.81	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC2.002870 putative iron transport system exported solute-binding component 313449:314522 forward MW:38352	272.76	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC1.004980 chaperonin GroEL 537292:538914 forward MW:57276	280.92	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC2.002930 Conserved putative secreted protein 320975:321796 forward MW:29860	849.23		0.7
Cp1002-SC2.011630 Putative trypsin-like serine protease 1354931:1356058 forward MW:41838	1356.4		1.13
Cp1002-SC2.008170 Hypothetical protein 948675:951008 reverse MW:85239	1168		0.92
Cp1002-SC2.008160 Putative membrane protein 947577:948476 reverse MW:31955	665.72		0.91
Cp1002-SC1.001010 Conserved hypothetical protein 118232:118799 forward MW:19817	807.89		1.63
Cp1002-SC1.000340 Putative surface-anchored protein 40318:42639 reverse MW:84995	1182		1.12
(P00489) Glycogen phosphorylase, muscle form OS=Oryctolagus cuniculus GN=PYGM PE=1 SV=3	1199		0.63
Cp1002-SC2.007870 NLPC_P60 protein 910645:911271 reverse MW:21410	106.69		0.58
Cp1002-SC1.004680 Putative pseudogene 508061:508870 forward MW:28905	231.53		1.12
Cp1002-SC2.012620 Putative esterase 1486515:1488449 reverse MW:70276	1592.8		1.09
Cp1002-SC1.005340 Putative secreted protein precursor 573426:574334 forward MW:32543	703.13		1.07
Cp1002-SC1.004670 Putative sialidase precursor 505812:507953 forward MW:77131	1535.1		0.94
Cp1002-SC1.000480 Putative secreted protein 60254:60673 reverse MW:14558	487.17		0.7
Cp1002-SC2.000930 resuscitation-promoting factor RpfB 101333:102484 forward MW:40221	1078.6		0.87
Cp1002-SC1.002740 Putative secreted protein 309190:310596 reverse MW:51449	534.65		1.26
Cp1002-SC1.005300 putative membrane protein; heme transport associated protein 568377:570224 forward MW:63999	698.68		1.07
Cp1002-SC1.003170 surface layer protein A 356061:357140 reverse MW:38581	665.45		1.38
Cp1002-SC2.013170 hypothetical protein DIP0522 Putative membrane protein 1550809:1552809 reverse MW:72315	1637.4		0.93
Cp1002-SC1.002530 Putative surface-anchored membrane protein 283944:287246 forward MW:119354	882.17		1.27

Cp1002-SC2.013160 hypothetical protein DIP0523 Putative membrane protein 1549672:1550796 reverse MW:41272	1276.4	0.72
Cp1002-SC2.005480 Putative secreted protein 631821:632162 forward MW:11576	251.13	1.8
Cp1002-SC2.001730 Putative trypsin-like serine protease 189983:190723 reverse MW:25623	402.86	1.14
Cp1002-SC2.010630 Putative major secreted protein PS1 1242571:1243752 forward MW:41663	211.8	0.7
Cp1002-SC2.001690 Putative peptide transport system secreted protein 184647:186227 forward MW:57273	434.45	0.9
Cp1002-SC2.012910 Hypothetical protein 1523954:1525954 reverse MW:72315	1637.4	0.9
Cp1002-SC2.012900 Hypothetical protein 1522817:1523941 reverse MW:41272	1276.4	0.72

Proteínas diferencialmente expressas entre os grupos Δ sigE e Δ sigE + DETA/NO

Description	Score	Unique	SIGE+DETA:SIGE_Rati
Cp1002-SC1.003270 Putative secreted protein 367793:368641 reverse MW:29500	145.75	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.000560 metalloendopeptidase-like membrane protein 65063:65776 reverse MW:24853	218.95	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.003020 Conserved hypothetical protein 333034:334848 forward MW:67249	226.81	SIGE	SIGE
Cp1002-SC2.009410 Thioredoxin-like protein 1096015:1096647 reverse MW:23747	103.23	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.010270 succinyl-CoA: Coenzyme A transferase 1203267:1204772 reverse MW:54499	124.77	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.003970 Hypothetical protein 440741:442702 forward MW:70863	344.96	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.004900 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 564090:565085 reverse MW:35941	222.01	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.000320 Hypothetical protein 35202:35783 reverse MW:21025	139.61	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.002730 Predicted membrane protein 307760:309193 forward MW:48188	128.83	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.004980 chaperonin GroEL 537292:538914 forward MW:57276	279.98	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.005470 Putative isomerase 630640:631494 forward MW:30007	70.32	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.012080 putative surface-anchored protein 1417601:1418386 reverse MW:27849	106.45	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.006100 Putative secreted protein 656698:657903 reverse MW:42988	90.95	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.005190 Putative ABC transport system exported protein 559281:560273 forward MW:35639	103.61	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.002930 Conserved putative secreted protein 320975:321796 forward MW:29860	700.67		1.72
Cp1002-SC2.002930 Conserved putative secreted protein 320975:321796 forward MW:29860	700.67		0.64
Cp1002-SC2.008170 Hypothetical protein 948675:951008 reverse MW:85239	1257.55		0.84
Cp1002-SC2.011420 Putative ABC transpoter membrane protein 1332197:1333168 forward MW:35472	170.27		0.61
Cp1002-SC2.008160 Putative membrane protein 947577:948476 reverse MW:31955	763.84		0.9
Cp1002-SC2.012640 Putative esterase 1490278:1491303 reverse MW:36582	278.84		4.22
Cp1002-SC1.003110 Putative secreted hydrolase 348332:349141 forward MW:28834	188.28		1.36
Cp1002-SC2.002870 putative iron transport system exported solute-binding component 313449:314522 forward MW:38352	283.89		1.58
Cp1002-SC1.001010 Conserved hypothetical protein 118232:118799 forward MW:19817	386.63		1.3
Cp1002-SC2.011170 Putative exported lipase 1298987:1300246 forward MW:44425	525.96		2.12
Cp1002-SC1.000340 Putative surface-anchored protein 40318:42639 reverse MW:84995 (P00489) Glycogen phosphorylase, muscle form OS= <i>Oryctolagus cuniculus</i> GN=PYGM PE=1 SV=3	1334		1.35
	890.72		0.84
Cp1002-SC2.007870 NLPC_P60 protein 910645:911271 reverse MW:21410	115.3		0.78

Cp1002-SC2.012620 Putative esterase 1486515:1488449 reverse MW:70276	1656.42	1.08
Cp1002-SC1.005340 Putative secreted protein precursor 573426:574334 forward MW:32543	432.51	1.28
Cp1002-SC1.006400 Putative secreted protein precursor 688895:689803 forward MW:32543	432.51	1.31
Cp1002-SC1.006360 putative membrane protein; heme transport associated protein 683845:685692 forward MW:63999	914.2	0.84
Cp1002-SC1.000480 Putative secreted protein 60254:60673 reverse MW:14558	575.17	1.62
Cp1002-SC2.001760 Hypothetical protein 191601:192308 reverse MW:24183	235.55	0.46
Cp1002-SC2.000930 resuscitation-promoting factor RpfB 101333:102484 forward MW:40221	997.03	0.9
Cp1002-SC2.010100 Putative secreted protein 1184325:1185164 reverse MW:30509	164.37	5.1
Cp1002-SC1.002740 Putative secreted protein 309190:310596 reverse MW:51449	238.34	0.82
Cp1002-SC1.005300 putative membrane protein; heme transport associated protein 568377:570224 forward MW:63999	914.2	0.86
Cp1002-SC1.003170 surface layer protein A 356061:357140 reverse MW:38581	1216.96	0.82
Cp1002-SC2.013170 hypothetical protein DIP0522 Putative membrane protein 1550809:1552809 reverse MW:72315	2065.84	0.92
Cp1002-SC2.011510 Putative pseudogene 1342986:1344475 reverse MW:54623	328.15	0.74
Cp1002-SC1.005850 Putative secreted protein 633274:634041 reverse MW:26706	321.02	0.52
Cp1002-SC1.002530 Putative surface-anchored membrane protein 283944:287246 forward MW:119354	800.61	1.15
Cp1002-SC2.013160 hypothetical protein DIP0523 Putative membrane protein 1549672:1550796 reverse MW:41272	1068.94	0.65
Cp1002-SC1.001500 Putative hydrolase 169502:170671 forward MW:41420	357.06	2.51
Cp1002-SC2.005480 Putative secreted protein 631821:632162 forward MW:11576	600.28	1.14
Cp1002-SC2.001730 Putative trypsin-like serine protease 189983:190723 reverse MW:25623	419.12	0.75
Cp1002-SC2.012480 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1466775:1468712 reverse MW:71119	245.14	2.1
Cp1002-SC1.002120 Hypothetical protein 234902:235588 reverse MW:24266	1066.75	0.9
Cp1002-SC2.012910 Hypothetical protein 1523954:1525954 reverse MW:72315	2065.84	0.92
Cp1002-SC2.005700 Putative metal-binding like protein 657041:657643 reverse MW:20810	432.85	5.75
Cp1002-SC2.012900 Hypothetical protein 1522817:1523941 reverse MW:41272	1068.94	0.63
Cp1002-SC1.004160 elongation factor Tu 464938:466128 forward MW:44000	424.19	1.26

Proteínas diferencialmente expressas entre os grupos 1002wt + DETA/NO e ΔsigE + DETA/NO

Description	Score	Unique	SIGE+DETA:WT+DETA_
Cp1002-SC2.001310 transcription elongation factor GreA 146164:146685 reverse MW:19013	201.44	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC1.002100 Putative glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase 231149:232039 forward MW:31483	180.81	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC1.003930 Putative periplasmic solute binding protein 436318:437943 forward MW:57776	315.44	WT+DETA	WT+DETA
Cp1002-SC1.001990 Putative zinc (Zn ²⁺) ABC superfamily ATP binding cassette transporter binding protein 218532:219524 forward MW:35635	183.97	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.012060 chaperone protein DnaK 1409855:1411687 reverse MW:65656	229.85	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.007690 hypothetical protein 891494:892192 reverse MW:24618	150.08	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.011420 Putative ABC transporter membrane protein 1332197:1333168 forward MW:35472	134.98	SIGE+DETA	SIGE+DETA

Cp1002-SC1.005760 Transcriptional regulator 623541:625109 reverse MW:55053	179.33	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.007680 putative penicillin-binding (cell division related) protein 889430:891457 reverse MW:73054	157.98	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.009410 Thioredoxin-like protein 1096015:1096647 reverse MW:23747	103.23	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.011170 Putative exported lipase 1298987:1300246 forward MW:44425	615.01	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.004160 Putative lipid/polyisoprenoid-binding, Ycel-like protein 476179:476871 reverse MW:24700	134.13	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.012590 acyl-CoA synthase 1482930:1484777 reverse MW:66470	436.85	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.002820 Putative penicillin-binding secreted protein 316873:319245 reverse MW:83034	218.33	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.001200 Putative secreted penicillin-binding protein 137896:139356 reverse MW:50755	181.43	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.006830 elongation factor Ts 783490:784389 reverse MW:32265	395.49	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.005360 Putative ABC-2 type transporter 618195:620216 reverse MW:70880	131.06	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.010270 succinyl-CoA: Coenzyme A transferase 1203267:1204772 reverse MW:54499	124.77	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.011530 Hypothetical protein 1345006:1345317 forward MW:10900	137.57	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.000300 Conserved integral membrane protein 30945:32846 reverse MW:65996	484.6	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.010100 Putative secreted protein 1184325:1185164 reverse MW:30509	159.78	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.007790 putative serine/threonine protein kinase 900358:902664 forward MW:81993	222.87	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.004900 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 564090:565085 reverse MW:35941	222.01	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.000320 Hypothetical protein 35202:35783 reverse MW:21025	139.61	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.002730 Predicted membrane protein 307760:309193 forward MW:48188	128.83	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.011700 fructose-bisphosphate aldolase 1363970:1365004 reverse MW:37144	98.48	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.006860 Transcriptional regulator 739278:740519 reverse MW:43561	165.74	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.005470 Putative isomerase 630640:631494 forward MW:30007	70.32	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.012080 putative surface-anchored protein 1417601:1418386 reverse MW:27849	106.45	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.006100 Putative secreted protein 656698:657903 reverse MW:42988	90.95	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC1.005190 Putative ABC transport system exported protein 559281:560273 forward MW:35639	103.61	SIGE+DETA	SIGE+DETA
Cp1002-SC2.002930 Conserved putative secreted protein 320975:321796 forward MW:29860	1038.31		2.39
Cp1002-SC1.000370 Putative surface-anchored membrane protein 44762:48169 reverse MW:122915	3580.95		0.74
Cp1002-SC2.011630 Putative trypsin-like serine protease 1354931:1356058 forward MW:41838	1512.86		3.82
Cp1002-SC2.008170 Hypothetical protein 948675:951008 reverse MW:85239	1282.53		0.7
Cp1002-SC2.009620 Secreted subtilisin-like peptidase 1124589:1126310 reverse MW:61146	458.33		0.48
Cp1002-SC2.008160 Putative membrane protein 947577:948476 reverse MW:31955	579.07		2.44
Cp1002-SC2.012640 Putative esterase 1490278:1491303 reverse MW:36582	439.23		2.66
Cp1002-SC1.003110 Putative secreted hydrolase 348332:349141 forward MW:28834	338.21		1.63
Cp1002-SC2.002870 putative iron transport system exported solute-binding component 313449:314522 forward MW:38352	272.76		2.64
Cp1002-SC1.001010 Conserved hypothetical protein 118232:118799 forward MW:19817	531.93		0.31
Cp1002-SC1.000340 Putative surface-anchored protein 40318:42639 reverse MW:84995	1515.34		0.9
(P00489) Glycogen phosphorylase, muscle form OS= <i>Oryctolagus cuniculus</i> GN=PYGM PE=1 SV=3	1029.65		0.74
Cp1002-SC2.007870 NLPC_P60 protein 910645:911271 reverse MW:21410	108.7		1.58
Cp1002-SC1.004680 Putative pseudogene 508061:508870 forward MW:28905	836.72		1.68

Cp1002-SC1.004480 undefined product 488619:489581 forward MW:34575	279.05	1.55
Cp1002-SC1.006370 Hemin receptor precursor 685818:686957 forward MW:40491	242.35	1.7
Cp1002-SC2.012620 Putative esterase 1486515:1488449 reverse MW:70276	1108.34	1.75
Cp1002-SC2.012780 Putative peptidoglycan recognition protein 1510050:1512332 forward MW:80577	306.83	1.75
Cp1002-SC1.005340 Putative secreted protein precursor 573426:574334 forward MW:32543	688.71	0.47
Cp1002-SC1.004670 Putative sialidase precursor 505812:507953 forward MW:77131	1478.25	0.32
Cp1002-SC1.006400 Putative secreted protein precursor 688895:689803 forward MW:32543	688.71	0.47
Cp1002-SC1.006360 putative membrane protein; heme transport associated protein 683845:685692 forward MW:63999	899.98	1.14
Cp1002-SC1.000480 Putative secreted protein 60254:60673 reverse MW:14558	543.05	108.85
Cp1002-SC2.013030 Conserved putative secreted protein 1537572:1539185 forward MW:56114	260.57	1.55
Cp1002-SC2.004880 Triosephosphate isomerase 561815:562594 reverse MW:27352	241.91	2.44
Cp1002-SC2.001760 Hypothetical protein 191601:192308 reverse MW:24183	293.01	1.35
Cp1002-SC2.000930 resuscitation-promoting factor RpfB 101333:102484 forward MW:40221	787.5	2.08
Cp1002-SC1.005310 Hemin receptor precursor 570350:571405 forward MW:37005	239.98	1.84
Cp1002-SC1.002740 Putative secreted protein 309190:310596 reverse MW:51449	399.98	0.69
Cp1002-SC1.005300 putative membrane protein; heme transport associated protein 568377:570224 forward MW:63999	899.98	1.27
Cp1002-SC1.003170 surface layer protein A 356061:357140 reverse MW:38581	656.12	1.13
Cp1002-SC2.013170 hypothetical protein DIP0522 Putative membrane protein 1550809:1552809 reverse MW:72315	1657.86	1.43
Cp1002-SC2.011510 Putative pseudogene 1342986:1344475 reverse MW:54623	367.38	2.77
Cp1002-SC2.012140 Putative pseudogene 1424276:1425900 reverse MW:58699	266.98	0.51
Cp1002-SC1.002530 Putative surface-anchored membrane protein 283944:287246 forward MW:119354	930.2	0.66
Cp1002-SC2.013160 hypothetical protein DIP0523 Putative membrane protein 1549672:1550796 reverse MW:41272	1093.23	1.11
Cp1002-SC2.005480 Putative secreted protein 631821:632162 forward MW:11576	277.08	0.74
Cp1002-SC2.001730 Putative trypsin-like serine protease 189983:190723 reverse MW:25623	536.96	1.82
Cp1002-SC2.010630 Putative major secreted protein PS1 1242571:1243752 forward MW:41663	360.84	1.62
Cp1002-SC1.004970 co-chaperonin GroES 536891:537280 forward MW:14085	223.75	0.77
Cp1002-SC2.012480 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1466775:1468712 reverse MW:71119	370.95	2.36
Cp1002-SC2.000300 putative transglycosylase 32691:33599 reverse MW:31648	285.45	1.43
Cp1002-SC1.002120 Hypothetical protein 234902:235588 reverse MW:24266	613.54	1.68
Cp1002-SC2.012910 Hypothetical protein 1523954:1525954 reverse MW:72315	1657.86	1.34
Cp1002-SC2.000060 Putative transglycosylase 7005:7628 reverse MW:21422	406.9	2.72
Cp1002-SC1.000180 Putative penicillin-binding protein 19631:21796 reverse MW:77160	322.31	1.95
Cp1002-SC2.012900 Hypothetical protein 1522817:1523941 reverse MW:41272	1093.23	1.14
Cp1002-SC1.004160 elongation factor Tu 464938:466128 forward MW:44000	345.01	1.32

9.2 Anexo II – Publicações durante o período de doutoramento

9.2.1 Lista de Trabalhos Publicados

9.2.2 Capítulo de Livro: *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*

PACHECO, L. G. C., MATI, V. L. T., Castro, TLP, DORELLA, Fernanda Alves, OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, Anderson, Melo, A. L., AZEVEDO, Vasco
Oral immunization with *Salmonella* harboring a Sm14-based DNA vaccine does not protect mice against *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology International.*, v.57, p.506 - 508, 2008.

PACHECO, L. G. C., PENA, R. R., Castro, TLP, DORELLA, Fernanda Alves, BAHIA, R. C., CARMINATI, R., FROTA, M. N. L., OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., ALVES, F. S. F., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology.*, v.56, p.480 - 486, 2007.

DIAS, A. A. S. O., SILVA, F. C., PEREIRA, G. A., SOUZA, M. C., CAMELLO, TCF, DAMASCENO, J. A., **Pacheco, Luis G.C.**, Miyoshi, A, Azevedo, Vasco A., Hirata, Raphael, BOAS, M.H.S.V., Mattos-Guaraldi, AL. *Corynebacterium ulcerans* Isolated from an Asymptomatic Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v.10, p. 1 - 6, 2010.

SILVA, V. D., PROSDOCIMI, F., MORAES, P., DORELLA, Fernanda Alves, **Pacheco, LGC**, ORTEGA, J. M., TEIXEIRA, S., Meyer, Roberto, MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Research.*, v.00, p.2 - 9, 2009.

SEYFFERT, N., Guimarães, A.S., **Pacheco, L.G.C.**, Portela, R.W., Bastos, B.L., Dorella, F.A., Heinemann, M.B., Lage, A.P., Gouveia, A.M.G., MEYER, R., Miyoshi, A, Azevedo, V
High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, p.50 - 55, 2010.

Dorella, Fernanda A, **Pacheco, LGC**, Seyffert, Núbia, PORTELA, R. W., MEYER, R., Miyoshi, A, Azevedo, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, v.8, p.205 - 213, 2009.

Mattos-Guaraldi, AL, Sampaio, JLM, Santos, CS, Pimenta, FP, Pereira, GA, **PACHECO, L. G. C.**, Miyoshi, A, Azevedo, V, Moreira, LO, Gutierrez, FL, Costa, JLF, Costa-Filho, R, Damasco, PV, Camello, TCF, Hirata Jr, R. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.103, p.396 - 400, 2008.

D'AFONSECA, V., MORAES, P., DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, MEYER, R., PORTELA, R. W., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research.*, v.7, p.252 - 260, 2008.

DORELLA, Fernanda Alves, ESTEVAM, E. M., **PACHECO, L. G. C.**, LANA, UGP, Guimarães, CT, OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.7368 - 7372, 2006.

DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research.*, v.37, p.201 - 218, 2006.

8

Corynebacterium and *Arcanobacterium*

R. Moore, A. Miyoshi, L. G. C. Pacheco, N. Seyffert, and V. Azevedo

CORYNEBACTERIUM

Corynebacterium species are nonmotile, nonsporulating, short, pleomorphic, gram-positive rods with a high G + C content in DNA. They belong to the class Actinobacteria and are part of the larger *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* (CMN) grouping. Bacteria of this group are characterized by cell walls containing long-chain fatty acids called mycolic acids; corynebacterial mycolic acids have relatively short chains, typically of 28–40 carbons. *Corynebacterium* species are found in a wide range of ecological niches, such as soil, sewage, and plant surfaces, and some are important pathogens of humans or animals.

The *Corynebacterium* spp. that infect animals and have some role in disease production comprise a lengthy list (table 8.1). Other species, including *Corynebacterium aquilae*, *Corynebacterium capitovis*, *Corynebacterium caspium*, *Corynebacterium ciconiae*, *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium felinum*, *Corynebacterium phocae*, *Corynebacterium sphenisci*, *Corynebacterium spheniscorum*, and *Corynebacterium testudinoris*, have been isolated from animals but without any clear connection to disease.

CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS

Corynebacterium pseudotuberculosis is the corynebacterial species most often seen in animal infections; it also has the greatest economic impact. *C. pseudotuberculosis* is a facultative intracellular pathogen that mainly affects small ruminants, such

as sheep and goats, causing a disease known as caseous lymphadenitis (CLA) or cheesy gland. CLA occurs throughout the world but is of most concern in large sheep-producing areas, such as Australia, New Zealand, South Africa, and the American continents. *C. pseudotuberculosis* infection can lead to decreased wool and meat production and increased culling of sick animals and condemnation of carcasses and skins in slaughterhouses (Williamson 2001; Paton et al. 2003; Dorella et al. 2006b). In the Americas, a similar disease occurs in farmed llamas and alpacas (Anderson et al. 2004; Braga et al. 2006). *C. pseudotuberculosis* often causes equine ulcerative lymphangitis, characterized by inflammation of the subcutaneous lymphatic vessels of the lower limbs. Ventral abscessation (also called pigeon fever, pigeon breast, or breastbone fever), folliculitis and furunculosis, and, rarely, mastitis and abortion are other manifestations of *C. pseudotuberculosis* infection in horses (Addo et al. 1974; Rumbaugh et al. 1978; Miers and Ley 1980; Poonacha and Donahue 1995). The organism can cause deep subcutaneous abscessation in cattle, as well as mastitis and necrotic-ulcerative dermatitis of the heel (Yeruham et al. 1997; Kariuki and Poulton 1982; Yeruham et al. 2003a, 2003b). Reports of human infections are rare; however, analysis of 12 cases revealed two that could be linked to occupational exposure, suggesting that a strong case could be made for human zoonotic *C. pseudotuberculosis* infection (Peel et al. 1997).

Classification of *C. pseudotuberculosis* was originally based on morphological and biochemical features, but chemotaxonomy revealed meso-

Table 8.1. *Corynebacterium* spp. Infections in Animal Hosts

<i>Corynebacterium</i> spp.	Major host	Disease	Other hosts	Other diseases
<i>amycolatum</i>	Human	Bacteremia, endocarditis, septic arthritis	Cattle	Mastitis
<i>auriscanis</i>	Dog	Otitis externa	Human	Wound infection
<i>bovis</i>	Cattle	Mastitis	Human, rabbit, hairless mouse	Abscesses, hyperkeratotic dermatitis
<i>camporealensis</i>	Sheep	Mastitis	^a	—
<i>cystitidis</i>	Cattle	Cystitis, pyelonephritis	—	—
<i>felinum</i>	Scottish wild cat	Unknown	—	—
<i>glucuronolyticum</i>	Human, pig	Genitourinary tract infection	—	—
<i>jeikeium</i>	Human	endocarditis, bacteremia, septicemia, meningitis, osteomyelitis	Cat	Urinary tract infection
<i>kutscheri</i>	Laboratory rodents	Abscesses, pneumonia, pseudotuberculosis, asymptomatic colonization	Human, vole	Septic arthritis
<i>mastitidis</i>	Sheep	Mastitis	—	—
<i>matruchotii</i>	Horse	Cystitis	—	—
<i>minutissimum</i>	Human	Mixed infection of skin	Cattle	Mastitis
<i>pilosum</i>	Cattle	Cystitis, pyelonephritis	Human, horse	Endocarditis
<i>pseudo-tuberculosis</i>	Sheep, goat, horse	Caseous lymphadenitis, pericarditis, pleuritis, cellulitis	Human, alpaca, cattle, camel, deer, pig	Lymphadenitis, abscesses, mastitis
<i>renale</i>	Cattle	Cystitis, pyelonephritis	Sheep, goat, deer, laboratory rodents	Cystitis, pyelonephritis, osteomyelitis
<i>suicordis</i>	Pig	Pericarditis	Primates, camel, cat, cattle, otter, squirrel	Respiratory infections, caseous lymphadenitis, mastitis
<i>ulcerans</i>	Human	Pharyngitis, sinusitis, skin infections	Dog, cat	—
<i>urealyticum</i>	Human	Cystitis, pyelonephritis	Goat	Paratuberculosis
<i>xerosis</i>	Pig	Arthritis, abscesses	—	—

^aNo other hosts or diseases have been reported.

diaminopimelic acid in its cell wall. Peptidoglycan, arabinose, and galactose are the major cell wall sugars, and short-chain mycolic acids (corynomycolic acids, 22–36 carbon atoms in length) are also present (Jones and Collins 1986). Other characteristics used to distinguish *C. pseudotuberculosis* from related species *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae* are production of phospholipase D (PLD) by *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* and production of diphtheria toxin by *C. diphtheriae* and some *C. ulcerans* strains (Barksdale et al. 1981; Groman et al. 1984; Buck et al. 1985; Cianciotto and Groman 1985; Cianciotto et al. 1986).

Results of biochemical testing and restriction endonuclease analysis of *C. pseudotuberculosis* chromosomal DNA led to recognition of distinct biovars *equi* and *ovis* (Songer et al. 1988). This finding was supported by analysis of 16S ribosomal DNA (Vaneechoutte et al. 1995; Sutherland et al. 1996; Costa et al. 1998). Phylogenetic analyses revealed that *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* belong to a monophyletic group (Riegel et al. 1995; Hou et al. 1997; Takahashi et al. 1997), but that biovars *equi* and *ovis* should not be classified as subspecies due to their high genomic similarity (Riegel et al. 1995). Use of partial gene sequences from the RNA polymerase β subunit-encoding gene (*rpoB*) has also proved useful in identification and classification of *Corynebacterium* species.

Pathogenesis

CLA is a chronic, granulomatous disease of sheep and goats, characterized primarily by the formation of abscesses within superficial lymph nodes and those draining the lungs. Transmission occurs mainly through contamination of superficial wounds (during shearing, castration, ear tagging, or other traumatic events) by exudate from superficial abscesses or via aerosols from lung lesions (Paton et al. 1995; Williamson 2001). The hypothesis of a respiratory route of infection (Stoops et al. 1984) was based on the observation that some naturally infected sheep have pulmonary lesions only and that some of these lesions are located on airway walls. It has also been possible to produce pulmonary disease by intratracheal administration of bacteria (Brown and Olander 1987). However, lung lesions have also been produced in sheep via intravenous inoculation (Brogden et al. 1984), so the importance of a direct respiratory route of infection remains unclear.

There is evidence of transmission by houseflies and by other Diptera in cattle, buffalo, and horses, although the mechanisms are not well documented (Yeruham et al. 1996; Selim 2001; Spier et al. 2004; Yeruham et al. 2004). Lesions rarely form at the site of entry, but the bacteria multiply and activate an inflammatory response. The bacteria are rapidly transported, generally via the lymphatic system, to proximal draining lymph nodes. There is an initial rapid accumulation of polymorphonuclear leukocytes at the entry point and in the draining lymph nodes, and this is followed within a few days by an increasing recruitment of macrophages (Guilloteau et al. 1990; Pepin et al. 1994). Intramacrophage survival is critical to the trafficking of *C. pseudotuberculosis* from the site of infection to superficial lymph nodes to internal lymph nodes and other reticuloendothelial tissues, where it produces characteristic caseous lesions (Batey 1986; Jolly 1966). Once established in the host, *C. pseudotuberculosis* evades the immune system with relative ease, causing chronic infections that persist for the life of the animal (Baird and Fontaine 2007).

Multiple microscopic pyogranulomas forming in the lymph node grow in size and coalesce to form larger abscesses (Pepin et al. 1991). This may be followed by further extension via the blood or the lymphatics, leading to production of similar lesions in other organs. Viable bacteria may be recovered from abscesses for years after initial infection, and latent disease may be reactivated in the face of appropriate stimuli.

Virulence Factors

Intra-host spread of *C. pseudotuberculosis* depends on PLD production (Carne and Onon 1978). This potent exotoxin has vasodilatory properties that wash the bacteria through the lymphatic system (McNamara et al. 1995; Songer 1997; Baird and Fontaine 2007). PLD also contributes to virulence via dermonecrosis, phagocyte toxicity, complement-dependent lysis of autologous erythrocytes, and lethality at higher doses (Egen et al. 1989; Songer 1997; Tambourgi et al. 2002). Activities of PLD commonly used for identification of *C. pseudotuberculosis* are synergistic hemolysis with *Rhodococcus equi* cholesterol oxidase and inhibition of the staphylococcal β -hemolytic activity (Baird and Fontaine 2007).

Murine or caprine macrophages may be damaged or destroyed due to PLD action. Infection of caprine macrophages resulted in vesiculation of the cytoplasm, mitochondrial damage, dilation of the endoplasmic reticulum, and death less than 20h after infection (Tashjian and Campbell 1983). Intracellular *C. pseudotuberculosis* has a small but significant effect on macrophage survival (McKean et al. 2007a).

Infection studies with *pld* deletion mutants demonstrated that PLD is essential for full virulence in sheep and goats (Hodgson et al. 1992; McNamara et al. 1994). Site-specific mutagenesis revealed that the His20 residue of PLD is part of the enzyme active site (Haynes et al. 1992). Comparison of *pld* sequences from strains of biovars *equi* and *ovis* revealed several amino acid differences between the predicted proteins; it is not clear whether this is a consistent difference distinguishing the biovars, as genes from only a single isolate of each were sequenced (McNamara et al. 1995). *pld* is down-regulated during heat shock (43°C) but is up-regulated in a cell-density-dependent manner and is highly expressed in infected macrophages (McKean et al. 2007a, 2007b).

Cell wall lipids of *C. pseudotuberculosis* have been considered virulence factors since their cytotoxicity was demonstrated more than 50 years ago (Carne et al. 1956). They protect the bacteria from intraphagocytic destruction but also induce hemorrhagic necrosis and chronic abscessation (Jolly 1966; Hard 1975; Muckle and Gyles 1983; Tashjian and Campbell 1983).

Iron acquisition is vital for *C. pseudotuberculosis*; the *fagBCD* operon, which encodes a putative iron uptake system, has been proposed as a virulence factor. There was no alteration in utilization of iron by a *fagB(C)* mutant *in vitro*, but this mutant had decreased ability to induce abscessation in goats (Billington et al. 2002).

Recent studies used whole genome screening methods to identify genes possibly involved in virulence. *C. pseudotuberculosis* genes expressed during infection of macrophages were identified via a differential fluorescence induction reporter system (McKean et al. 2005). Random transposon mutagenesis with the TnFuZ system identified *C. pseudotuberculosis* genes encoding exported proteins, which are being evaluated for roles in virulence (Dorella et al. 2006a).

Immunity and Vaccination

Primary immune responses to *C. pseudotuberculosis* infection are complex and are mediated by cellular interactions and cytokines. Secondary responses occur through multiple pathways (Ellis et al. 1990; Pepin et al. 1997; Paule et al. 2003). Intact MHC class II staining macrophages and various subpopulations of lymphocytes, organized in three distinct regions, have been identified inside encapsulated lesions, and there is evidence that continual lymphocyte recruitment is a feature of chronic CLA (Walker et al. 1991). Interferon-gamma (IFN- γ) and complement receptor 3 (CR3) play important roles in control of primary *C. pseudotuberculosis* infections in mice (Simmons et al. 1997; Lan et al. 1999a) and IFN- γ , CR3, and tumor necrosis factor alpha TNF- α are important in the host response to secondary infections (Lan et al. 1999a, 1999b).

Commercial vaccines are available in various regions of the world. Combined vaccines of the Glanvac™ series, now marketed by Pfizer in Australia, are efficacious under Australian conditions (Eggleton et al. 1991) but were less successful when used in a British study (Fontaine et al. 2006). Vaccination of goats with Glanvac resulted in significant protection against subsequent experimental inoculation with *C. pseudotuberculosis*, as evidenced by a decreased number of lesions (Brown et al. 1986). CLA vaccines are produced in the United States by Colorado Serum Company (Caseous D-T™ and Case-Bac; Piontkowski and Shivvers 1998). Fort Dodge Animal Health also produces a vaccine (Biodectin®). A live attenuated strain of *C. pseudotuberculosis* has been licensed for use as a vaccine in Brazil and is being developed further by the Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (www.ebda.ba.gov.br).

CLA remains prevalent in the field in spite of the availability of commercial vaccines for a long time. Several experimental vaccines have been investigated. Rationally, attenuated strains, from which *pld* was deleted (Hodgson et al. 1992), offered some protection, but efficacy was improved by inserting a genetically toxoided PLD to provide anti-PLD immunity (Tachedjian et al. 1995). Rationally, attenuated strain Toxminus has also been evaluated as a live vector for delivery of heterologous antigens (Moore et al. 1999, 2001). Live, attenuated vaccines have been produced against other pathogens (e.g., *Salmonella*) by deleting genes in the aromatic amino acid biosynthetic pathway. This approach has also

been tested in *C. pseudotuberculosis* with an *aroQ* mutant, but this mutant strain offered no useful protection (Simmons et al. 1998). A DNA vaccine expressing genetically attenuated PLD fused to cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 to target antigen presenting cells yielded 70% efficacy in a challenge trial (Chaplin et al. 1999). A 40-kDa antigen, identified by isolation and screening of antibody-secreting cells from the immediate area of infected lymph nodes, was partially protective (Walker et al. 1994). Other studies identified immunodominant antigens by probing the proteome with immune sera from infected goats and sheep (Muckle et al. 1992; Braithwaite et al. 1993; Paule et al. 2004). These antigens may be useful in diagnostics or vaccines but have not yet been investigated in these contexts. Application of recent rapid advances in whole genome sequencing (<http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br>) is likely to provide new opportunities to identify other virulence determinants and develop new strategies for design of vaccines.

OTHER CORYNEBACTERIA

A wide range of other *Corynebacterium* spp. have apparent pathogenic effects in animals (table 8.1), but most of these diseases are rare or mild. The limited importance of these diseases has restricted work to understand underlying virulence mechanisms.

Corynebacterium bovis primarily colonizes the bovine teat canal and is generally considered mildly pathogenic. It is nonetheless highly contagious, often being transmitted via contaminated milking equipment (Bramley et al. 1976). *C. bovis* causes occasional udder infections, with a mild increase in somatic cell count and a slight reduction in milk production. The organism is sometimes the only organism found in milk from cows with clinical mastitis, but the open question is whether it is the primary pathogen or an incidental finding due to its common asymptomatic carriage on the teat. Colonization with *C. bovis* may (Linde et al. 1980; Brooks and Barnum 1984) or may not (Honkanen-Buzalski et al. 1984; Hogan et al. 1988) protect against infection with the major mastitis pathogen *Staphylococcus aureus*.

Corynebacterium kutscheri is a common pathogen of laboratory rats, mice, and Syrian hamsters. Healthy rodents carry *C. kutscheri* as a commensal of the oral and nasal cavities and colorectum (Amao et al. 1995). Stressed animals are immunosup-

pressed, and a *C. kutscheri* infection (pseudotuberculosis) can develop as a result. A 100% infection rate can occur in an animal facility. Susceptibility varies with mouse strain, and male ICR mice males are more susceptible than females (Komukai et al. 1999). The organism is apparently present outside of laboratory facilities; the most recent and reliable diagnosis of human infection by the organism was in an infant bitten by a rat (Holmes and Korman 2007). It has also been isolated from wild voles (Barrow 1981).

C. kutscheri expresses a glycoprotein with nonspecific immunostimulatory effects on cytokine production by splenocytes and macrophages, and infections increase expression of host galectin-3, a powerful proinflammatory signal molecule (Kita et al. 1992; Won et al. 2007). These immunostimulatory properties may contribute to the nonspecific resistance induced by *C. kutscheri* but, when uncontrolled, may also lead to pathology.

Corynebacterium renale, *Corynebacterium pilosum*, and *Corynebacterium cystitidis* were all originally classified as serological types of *C. renale* but were subsequently recognized as separate species (Yanagawa and Honda 1978). They all cause bovine cystitis and pyelonephritis, but *C. renale* is most commonly isolated and is also found in cases of ovine cystitis and pyelonephritis and in caprine osteomyelitis (Higgins and Weaver 1981; Altmaier et al. 1994). Severe hemorrhagic cystitis with bladder ulceration, progressing to ureteritis and pyelonephritis, can be caused by *C. cystitidis* and is more severe than the generally mild cystitis caused by *C. pilosum*. These organisms are among the normal microflora in the bovine reproductive tract and can survive long periods in soil. Thus, there may be a cycle of infection, from contaminated urine to pasture to reinfection of the urinary tract (Hayashi et al. 1985). A distinguishing characteristic of *C. renale* is production, by most isolates, of an extracellular protein, renalin. This protein lyses erythrocytes in synergy with *S. aureus* β toxin and may be a virulence factor. The staphylococcal toxin apparently hydrolyzes sphingomyelin, producing ceramide, and then renalin interacts nonenzymatically with ceramide to lyse cells (Bernheimer and Avigad 1982). Experiments in rats have indicated that the potent urease of *C. renale* plays a crucial role in establishment of pyelonephritis (Jerusik et al. 1977). Adherence to host cells is also a vital step in pathogenesis, and pili of *C. renale* play a focal role;

antibodies to pili block adherence to cultured cells and to the mucus membrane of the mouse bladder (Honda and Yanagawa 1975, 1978).

C. ulcerans is the causative agent of several animal diseases, including bovine mastitis (Lipsky et al. 1982; Watts 1988) and other infections of camels, squirrels, dogs, cats, monkeys, killer whales, and lions (Tejedor et al. 2000; Seto et al. 2008). PLD, similar to that of *C. pseudotuberculosis*, is produced by all isolates of *C. ulcerans*; this toxin is presumed to be important in pathogenesis, but this has not been experimentally verified (McNamara et al. 1995). Some isolates of *C. ulcerans* are lysogenized by corynephage β , which carries *tox* and encodes diphtheria toxin (Schuhegger et al. 2008; Seto et al. 2008); in humans, these strains have been found in clinical cases presenting with diphtheria. Other potential virulence factors have been identified, including urease and iron-scavenging mechanisms (Riegel et al. 1995; Kunkle and Schmitt 2007).

The closely related *Corynebacterium urealyticum* and *Corynebacterium jeikeium* are primarily opportunistic pathogens of humans but may also cause urinary tract infections in animals. Knowledge of these organisms has taken a giant step forward with elucidation of the complete genomic sequence of a human clinical isolate of each species (Tauch et al. 2005, 2008). Genomic information has revealed several genes predicted to encode proteins important in the host/pathogen interaction and virulence; examples are surface-anchored attachment factors, secreted enzymes, and the urease of *C. urealyticum*. The newly developed next generation high-throughput DNA sequencing instruments usher in a new era in microbiology where it is quite feasible that complete genomic data will be available for every bacterium of interest. The background information provided by this technology changes the nature of the studies that can be carried out and is precipitating a revolution in the specific and comparative analysis of bacterial pathogenesis. The future challenge will be to devise efficient ways to determine, via this comprehensive genomic information, the function of genes and to screen for useful properties, such as vaccine efficacy.

ARCANOBACTERIUM

Members of the genus *Arcanobacterium* are small gram-positive, pleomorphic, but generally rod-shaped, bacteria that are nonmotile and non-spore

forming. The genus was created by reclassification of *Corynebacterium haemolyticum* to *Arcanobacterium haemolyticum*, based on cell wall fatty acids and peptidoglycan components that differed from those of corynebacteria (Collins et al. 1982). The peptidoglycan of arcanobacteria contains lysine, rhamnose, and glucose, but not mycolic acid. Characterization of 16S rRNA sequences has been a useful tool in the classification of other bacteria to the genus *Arcanobacterium*, including *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces bernardiae* (Ramos et al. 1997), and the classification of the other species of *Arcanobacterium* has been principally directed by the sequencing of 16S rRNA genes (Lehnen et al. 2006). Eight species now comprise the genus *Arcanobacterium*, six of which were isolated from animals (table 8.2). *A. pyogenes* is the only species isolated from animals that has been studied in any detail.

ARCANOBACTERIUM PYOGENES

Arcanobacterium pyogenes is the most widely reported *Arcanobacterium* species. It has been implicated as the cause of various diseases in a wide variety of animals, including all major domesticated food animals. It is often found among the resident microbiota on mucus membranes (gastrointestinal, genital, and upper respiratory) and skin of healthy animals. It is isolated from the bovine rumen (Narayanan et al. 1998) and the stomach of pigs (Jost et al. 2002).

Arcanobacterium pyogenes is an opportunistic pathogen that causes suppurative infections in a variety of organs, including the skin, joints, testes, and visceral organs. Infections generally follow damage to mucous membranes by direct physical trauma, immunological action, or infection by other microorganisms. *A. pyogenes* infections have been found in a very wide variety of mammals and even some birds, but infections are rare in humans.

Pathogenesis

Arcanobacterium pyogenes causes suppurative infections, in the form of abscesses, empyemas, and pyogranulomas, often in concert with other bacteria, mainly non-spore-forming anaerobes recruited from resident commensal bacterial populations (e.g., *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*). Infection can result in abortion, arthritis, endocardi-

Table 8.2. *Arcanobacterium* spp. Infections in Animal Hosts

<i>Arcanobacterium</i> spp	Host	Disease ^a
<i>bernardiae</i>	Human	Abscesses, septicemia
<i>bialowiezense</i>	Bison	Edema and necrosis of skin
<i>bonsai</i>	Bison	Edema and necrosis of skin
<i>haemolyticum</i>	Human	Pharyngitis, wound infections
<i>hippocoleae</i>	Horse	Vaginitis
<i>phocae</i>	Seal	Superficial abscesses
	Otter	
	Dolphin	
<i>pluranimalium</i>	Deer	Lung abscess
	Porpoise	Unknown
<i>pyogenes</i>	Cattle	Mastitis, endocarditis, liver abscess, endometritis,
	Deer	abortion
	Goat	Pneumonia, intracranial abscesses
	Pig	Mastitis, abscesses
	Poultry	Pneumonia, endocarditis, septic arthritis
	Sheep	Osteomyelitis, nephritis, pneumonia, endometritis, abortion, orchitis

^aAn association with certain diseases has been noted, but, in most cases, there is no definitive proof that the *Arcanobacterium* isolate is the causative agent.

tis, mastitis, pneumonia, osteomyelitis, infertility, and vesiculitis. Abscesses are often heavily encapsulated, resulting in ineffectiveness of antibiotic therapy.

Liver abscesses, mastitis, and abortion are the most commonly reported diseases involving *A. pyogenes* infections in cattle. In liver abscesses, *Fusobacterium necrophorum* is the primary etiological agent with *A. pyogenes* being the second most frequently isolated pathogen. The disease is commonly found in cattle from grain-feeding programs with incidence up to 30% in some feedlots. Dietary and management factors influence the incidence. A sudden change to high-energy grain diets can lead to acidosis and ulceration of the rumen, which provides an entry point for pathogens to invade the blood stream and be deposited by portal circulation in the liver, with subsequent abscess formation (Nagaraja and Lechtenberg 2007). Economic consequences can be significant since cattle with liver abscesses have reduced feed intake, reduced weight gain, decreased feed efficiency, and decreased carcass dressing percentage (Brink et al. 1990).

Because *A. pyogenes* is commonly found in the normal commensal microflora of susceptible species, the incidence of disease is sporadic and

depends on the presence of precipitating stresses or physical damage. *A. pyogenes* can cause severe mastitis in cows, with bacteria entering via injured teats from contaminated milking equipment. Clinical cases may be mixed infections. So-called summer mastitis may be spread by flies, which carry the organism to traumatized teats (Hillerton et al. 1990).

Arcanobacterium pyogenes is the most common opportunistic bacterium causing sporadic abortions. Such abortions may occur at any stage in gestation but are more common in the second half of gestation. *A. pyogenes*-induced abortion is sometimes associated with concomitant bovine viral diarrhea virus infection (Kirkbride 1993), but production of disease with pure cultures indicates that *A. pyogenes* can act as a primary pathogen (Semambo et al. 1991).

Orchitis in rams (Gouletsou et al. 2004) and mastitis in both dry and lactating cows (Hillerton and Bramley 1989) have been experimentally reproduced via inoculation with pure cultures of *A. pyogenes*. Such experimental infection systems, coupled with the ability to construct specific directed mutants in some isolates of *A. pyogenes* (Jost et al. 1999, 2002), offer the opportunity to test engineered mutant strains for virulence in definitive hosts.

Virulence Factors

Actinomyces pyogenes produces several virulence factors, including tissue-damaging toxins and enzymes and attachment and colonization factors. It can cause a variety of diseases in multiple species, but there is no indication that particular virulence factors are associated with specific disease processes or particular hosts. Proteins suggested to be virulence factors (pyolysin [PLO], collagen binding protein, neuraminidase, and DNase) are ubiquitous among isolates (Lammler and Blobel 1988; Silva et al. 2008).

PLO is secreted by all strains of *A. pyogenes*. It is a pore-forming, cholesterol-dependent cytolysin (CDC) and is a major virulence determinant. *plo* mutants have reduced virulence in a mouse model (Jost et al. 1999). The properties and mode of action of PLO can, to some degree, be inferred from its similarity to other CDCs, which bind to cholesterol-containing rafts in the eukaryotic cell membrane, forming pores and resulting in death of the cell (Giddings et al. 2003; Rosado et al. 2008). They promote cytolysis of immune cells and alter host cytokine expression (Houldsworth et al. 1994; Nishibori et al. 1996; Ruiz et al. 1998). PLO is also responsible for the hemolysis observed when *A. pyogenes* is grown on blood-containing media. PLO is dermonecrotic and lethal when delivered IV or IP. The specific action of PLO *in vivo* is unknown, but it is assumed that its pleiotropic effects include damage to host cell membranes, with concomitant influences on the manifestation of disease. PLO expression is regulated *in vitro*, with increased expression during early stationary phase. Expression of PLO may be regulated by a two-component sensor kinase system (Jost and Billington 2005).

Extracellular matrix-binding proteins recognize components of the host tissue matrix to which *A. pyogenes* adheres as a necessary first step in colonization and persistence. *A. pyogenes* can bind to collagen, fibrinogen, and fibronectin; *cbpA*, the structural gene for collagen-binding protein, was found in 48% of North American strains (Esmay et al. 2003). Recombinant CbpA binds strongly to collagen types I, II, III, IV, and XI and weakly to types V and IX (Pietrocola et al. 2007) but does not bind to denatured collagen (Esmay et al. 2003). CbpA also binds to fibronectin (Pietrocola et al. 2007) via a subsite different from that involved in collagen binding. A *cbpA* mutant had a greatly reduced capacity to adhere to epithelial and fibroblast cell

lines (Esmay et al. 2003), and antibodies to CbpA blocked the interaction of CbpA with collagen (Pietrocola et al. 2007). The importance of collagen binding in colonization is not clear, as collagen is not exposed in normal healthy tissue; therefore, CbpA may be principally involved with adherence to damaged tissue, or other properties may be more important.

Other potential adherence factors, such as fimbriae and a 20-kDa fibronectin-binding protein, have been reported (Jost and Billington 2005), but no detailed characterization is yet available.

Actinomyces pyogenes produces neuraminidase, and two neuraminidase genes have been identified. *nanH* has been found in all isolates, whereas *nanP* was in 64% of isolates in one study (Jost et al. 2002) and 100% of isolates in a second study (Silva et al. 2008). Both proteins are cell wall anchored. Neuraminidases cleave terminal sialic acid residues from carbohydrates and glycoproteins. In some bacteria, this exposes cryptic host cell receptors and allows bacterial adhesion. In *A. pyogenes*, a double mutant with no neuraminidase activity had reduced ability to bind to HeLa cells, indicating an important role for neuraminidases in adhesion (Jost et al. 2002).

Actinomyces pyogenes expresses other enzymes that may play some role in virulence. Zymogram-based studies have found five protein bands on SDS-PAGE with protease activity; all degraded gelatin, but three lower molecular weight proteins degraded only casein. They were tentatively identified as Ca²⁺-dependent serine proteases (Takeuchi et al. 1995). No mutant studies have been carried out to investigate a definitive role for proteases in *A. pyogenes* pathogenesis. However, antibodies to proteases were much more prevalent in pigs with *A. pyogenes* abscesses (93%) than in control (35%), suggesting that proteases are expressed during the disease process (Takeuchi et al. 1979).

All *A. pyogenes* isolates produce a secreted DNase (Lammler and Blobel 1988). DNase may aid in the release of bacteria from disintegrating host cells in inflammatory lesions by digesting host DNA and reducing local viscosity. The action of DNase may also make nucleotides available for bacterial utilization.

Vaccines

Vaccination with crude whole cells or culture supernatant of *A. pyogenes* has not offered any useful level of protection to sheep or cattle (Ding et al.

1998; Hunter et al. 1990), but some success has been seen in a mouse challenge model (Cameron et al. 1976). Vaccination with formalin-inactivated PLO, recombinant PLO, and genetically attenuated PLO gives protective immune responses in mice (Jost et al. 1999, 2003), but similar studies have not been conducted in host animals. Healthy animals naturally colonized with *A. pyogenes* often have antibodies to the organism and to PLO, but these offer no protection from disease. Vaccination with whole cell and culture supernatant can increase antibody titers without giving any protection. This has led to doubts that serum antibodies offer protection, even though passive immunization of mice with PLO-specific serum prevented *A. pyogenes* infection (Billington et al. 1997). To date, no other potential antigens have been tested in challenge trials.

FUTURE DIRECTIONS

Elucidation of the factors involved in virulence of corynebacteria and arcanobacteria (particularly *A. pyogenes* and the high-profile *Corynebacterium* spp.) is justified by their impact on animal production worldwide. Interest in *C. pseudotuberculosis* and CLA is highest in areas of the world where small ruminants play a major role in the agricultural economy. Clear understanding of virulence of this organism, leading to effective, easily delivered means of prevention, will have major impact on many nations but especially on the developing world. *A. pyogenes* is isolated virtually every day from multiple species in veterinary diagnostic laboratories around the world and is thought by some to be the most widely distributed, most common opportunistic pathogen of mucosal surfaces in domestic animals. The economic impact of these infections is much more difficult to estimate than those resulting from the dramatic, epidemic disease affected animal production, but they must be substantial. There are many opportunities to have major impact on these losses, beginning perhaps with a more fundamental understanding of the biology of pathogenic corynebacteria and arcanobacteria through application of high-throughput genomics. Rational evaluation of the resulting data and *in vivo* testing of virulence hypotheses should yield targets for therapeutic and vaccination approaches.

REFERENCES

- Addo, P. B., G. E. Wilcox, and R. Taussig. 1974. Mastitis in a mare caused by *C. ovis*. *Vet Rec.* 95:193.
- Altmairer, K. R., D. M. Sherman, S. H. Schelling, R. D. Fister, and C. R. Lamb. 1994. Osteomyelitis and disseminated infection caused by *Corynebacterium renale* in a goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:934–937.
- Amao, H., Y. Komukai, T. Akimoto, M. Sugiyama, K. W. Takahashi, T. Sawada, et al. 1995. Natural and subclinical *Corynebacterium kutscheri* infection in rats. *Lab. Anim. Sci.* 45:11–14.
- Anderson, D. E., D. M. Rings, and J. Kowalski. 2004. Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in five alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225:1743–1747.
- Baird, G. J., and M. C. Fontaine. 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137:179–210.
- Barksdale, L., R. Linder, I. T. Sulea, and M. Pollice. 1981. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* 13: 335–343.
- Barrow, P. A. 1981. *Corynebacterium kutscheri* infection in wild voles (*Microtus agrestis*). *Br. Vet. J.* 137:67–70.
- Batey, R. G. 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 63:269–272.
- Bernheimer, A. W., and L. S. Avigad. 1982. Mechanism of hemolysis by Renalin, a CAMP-like protein from *Corynebacterium renale*. *Infect. Immun.* 36:1253–1256.
- Billington, S. J., P. A. Esmay, J. G. Songer, and B. H. Jost. 2002. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:41–45.
- Billington, S. J., B. H. Jost, W. A. Cuevas, K. R. Bright, and J. G. Songer. 1997. The *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. *J. Bacteriol.* 179:6100–6106.
- Braga, W. U., A. Chavera, and A. Gonzalez. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in highland alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Vet. Rec.* 159:23–24.
- Braithwaite, C. E., E. E. Smith, J. G. Songer, and A. H. Reine. 1993. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 38:59–70.

5

- 6 Bramley, A. J., R. G. Kingwill, T. K. Griffin, and D. L. Simpkin. 1976. Prevalence of *Corynebacterium bovis* in bovine milk samples. *Vet. Rec.* 99:275.
- Brink, D. R., S. R. Lowry, R. A. Stock, and J. C. Parrott. 1990. Severity of liver abscesses and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 68:1201–1207.
- Brogden, K. A., R. C. Cutlip, and H. D. Lehmkühl. 1984. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 45:1532–1534.
- Brooks, B. W., and D. A. Barnum. 1984. The susceptibility of bovine udder quarters colonized with *Corynebacterium bovis* to experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus agalactiae*. *Can. J. Comp. Med.* 48:146–150.
- Brown, C. C., and H. J. Olander. 1987. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.* 57:1–12.
- Brown, C. C., H. J. Olander, E. L. Biberstein, and S. M. Morse. 1986. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1116–1119.
- Buck, G. A., R. E. Cross, T. P. Wong, J. Loera, and N. Groman. 1985. DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages. *Infect. Immun.* 49:679–684.
- Cameron, C. M., W. F. Botha, and B. H. Smit. 1976. Antibody response to and immunity induced by *Corynebacterium pyogenes* vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 43:97–103.
- Carne, H. R., J. C. Kater, and N. Wickham. 1956. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. *Nature* 178:701–702.
- Carne, H. R., and E. O. Onon. 1978. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature* 271:246–248.
- Chaplin, P. J., R. De Rose, J. S. Boyle, P. McWaters, J. Kelly, J. M. Tennent, et al. 1999. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 67:6434–6438.
- Cianciotto, N., and N. Groman. 1985. A beta-related corynebacteriophage which lacks a tox allele but can acquire it by recombination with converting phage. *Infect. Immun.* 49:32–35.
- Cianciotto, N., R. Rappuoli, and N. Groman. 1986. Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp. *J. Bacteriol.* 168:103–108.
- Collins, M. D., D. Jones, and G. M. Schofield. 1982. Reclassification of “*Corynebacterium haemolyticum*” (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen.nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom.rev., comb. nov. *J. Gen. Microbiol.* 128:1279–1281.
- Costa, L. R., S. J. Spier, and D. C. Hirsh. 1998. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Microbiol.* 62:135–143.
- Ding, H., C. Lammler, and U. Vecht. 1998. Measurement of *Actinomyces pyogenes* specific antibodies in bovine blood samples by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Med. B.* 45:297–303.
- Dorella, F. A., E. M. Estevam, L. G. Pacheco, C. T. Guimaraes, U. G. Lana, E. A. Gomes, et al. 2006a. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7368–7372.
- Dorella, F. A., L. G. Pacheco, S. C. Oliveira, A. Miyoshi, and V. Azevedo. 2006b. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37:201–218.
- Egen, N. B., W. A. Cuevas, P. J. McNamara, D. W. Sammons, R. Humphreys, and J. G. Songer. 1989. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50:1319–1322.
- Eggleton, D. G., C. V. Doidge, H. D. Middleton, and D. W. Minty. 1991. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust. Vet. J.* 68:320–321.
- Ellis, J. A., D. A. Hawk, L. D. Holler, K. W. Mills, and D. L. Pratt. 1990. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:1609–1613.
- Esmay, P. A., S. J. Billington, M. A. Link, J. G. Songer, and B. H. Jost. 2003. The *Arcanobacterium pyogenes* collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells. *Infect. Immun.* 71:4368–4374.
- Fontaine, M. C., G. Baird, K. M. Connor, K. Rudge, J. Sales, and W. Donachie. 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against

- infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vaccine 24:5986–5996.
- Giddings, K. S., A. E. Johnson, and R. K. Tweten. 2003. Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:11315–11320.
- Gouletsou, P. G., G. C. Fthenakis, P. J. Cripps, N. Papaioannou, T. Lainas, D. Psalla, et al. 2004. Experimentally induced orchitis associated with *Arcanobacterium pyogenes*: clinical, ultrasonographic, seminological and pathological features. Theriogenology 62:1307–1328.
- Groman, N., J. Schiller, and J. Russell. 1984. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from corynephage beta and *Corynebacterium diphtheriae*. Infect. Immun. 45:511–517.
- Guilloteau, L., M. Pepin, P. Pardon, and A. Le Pape. 1990. Recruitment of 99m-technetium- or 111-indium-labelled polymorphonuclear leucocytes in experimentally induced pyogranulomas in lambs. J. Leukoc. Biol. 48:343–352.
- Hard, G. C. 1975. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. Infect. Immun. 12:1439–1449.
- Hayashi, A., R. Yanagawa, and H. Kida. 1985. Survival of *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium pilosum* and *Corynebacterium cystitidis* in soil. Vet. Microbiol. 10:381–386.
- Haynes, J. A., J. Tkalcovic, and I. T. Nisbet 1992. Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Gene 119:119–121.
- Higgins, R. J., and C. R. Weaver. 1981. *Corynebacterium renale* pyelonephritis and cystitis in a sheep. Vet. Rec. 109:256.
- Hillerton, J. E., and A. J. Bramley. 1989. Infection following challenge of the lactating and dry udder of dairy cows with *Actinomyces pyogenes* and *Peptostreptococcus indolicus*. Br. Vet. J. 145:148–158.
- Hillerton, J. E., A. J. Bramley, and G. Thomas. 1990. The role of *Hydrotaea irritans* in the transmission of summer mastitis. Br. Vet. J. 146:147–156.
- Hodgson, A. L., J. Krywult, L. A. Corner, J. S. Rothel, and A. J. Radford. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect. Immun. 60:2900–2905.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1988. Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. J. Dairy Sci. 71:2520–2525.
- Holmes, N. E., and T. M. Korman. 2007. *Corynebacterium kutscheri* infection of skin and soft tissue following rat bite. J. Clin. Microbiol. 45:3468–3469.
- Honda, E., and R. Yanagawa. 1975. Attachment of *Corynebacterium renale* to tissue culture cells by the pili. Am. J. Vet. Res. 36:1663–1666.
- Honda, E., and R. Yanagawa. 1978. Pili-mediated attachment of *Corynebacterium renale* to mucous membrane of urinary bladder of mice. Am. J. Vet. Res. 39:155–158.
- Honkanen-Buzalski, T., T. K. Griffin, and F. H. Dodd. 1984. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. I. Natural infection. J. Dairy Res. 51:371–378.
- Hou, X.-G., Y. Kawamura, F. Sultana, K. Hirose, M. Miyake, Y. Otsuka, et al. 1997. Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. Microbiol. Immunol. 41:453–460.
- Houldsworth, S., P. W. Andrew, and T. J. Mitchell. 1994. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 62:1501–1503.
- Hunter, P., J. J. van der Lugt, and J. J. Gouws. 1990. Failure of an *Actinomyces pyogenes* vaccine to protect sheep against an intravenous challenge. Onderstepoort J. Vet. Res. 57:239–241.
- Jerusik, R. J., S. Kadis, W. L. Chapman Jr, and R. E. Wooley. 1977. Influence of acetohydroxamic acid on experimental *Corynebacterium renale* pyelonephritis. Can. J. Microbiol. 23:1448–1455.
- Jolly, R. D. 1966. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. J. Appl. Bacteriol. 29:189–196.
- Jones, D., and R. D. Collins. 1986. Irregular, nonsporing gram-positive rods. In Bergey's manual of systematic bacteriology. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.). Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 1261–1282.
- Jost, B. H., and S. J. Billington. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek 88:87–102.
- Jost, B. H., K. W. Post, J. G. Songer, and S. J. Billington. 1992. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. Vet. Res. Commun. 26:419–425.

- Jost, B. H., J. G. Songer, and S. J. Billington. 1999. An *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolytic pyolysin has reduced virulence. *Infect. Immun.* 67:1723–1728.
- Jost, B. H., J. G. Songer, and S. J. Billington. 2002. Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. *Infect. Immun.* 70:1106–1112.
- Jost, B. H., H. T. Trinh, J. G. Songer, and S. J. Billington. 2003. Immunization with genetic toxoids of the *Arcanobacterium pyogenes* cholesterol-dependent cytolytic, pyolysin, protects mice against infection. *Infect. Immun.* 71:2966–2969.
- Kariuki, D. P., and J. Poulton. 1982. Corynebacterial infection of cattle in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* 14:33–36.
- Kirkbride, C. A. 1993. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:64–68.
- Kita, E., N. Kamikaidou, D. Oku, A. Nakano, N. Katsui, and S. Kashiba. 1992. Nonspecific stimulation of host defense by *Corynebacterium kutscheri*. III. Enhanced cytokine induction by the active moiety of *C. kutscheri*. *Nat. Immunol.* 11:46–55.
- Komukai, Y., H. Amao, N. Goto, Y. Kusajima, T. Sawada, M. Saito, et al. 1999. Sex differences in susceptibility of ICR mice to oral infection with *Corynebacterium kutscheri*. *Exp. Anim.* 48:37–42.
- Kunkle, C. A., and M. P. Schmitt. 2007. Comparative analysis of *hmuO* function and expression in *Corynebacterium* species. *J. Bacteriol.* 189:3650–3654.
- Lammler, C., and H. Blobel. 1988. Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*. *Med. Microbiol. Immunol.* 177:109–114.
- Lan, D. T., S. Makino, T. Shirahata, M. Yamada, and A. Nakane. 1999a. Complement receptor type 3 plays an important role in development of protective immunity to primary and secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 43:1103–1106.
- Lan, D. T., S. Makino, T. Shirahata, M. Yamada, and A. Nakane. 1999b. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61:1203–1208.
- Lehnen, A., H. J. Busse, K. Frolich, M. Krasinska, P. Kampf, and S. Speck. 2006. *Arcanobacterium bialowiezense* sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov., isolated from the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis, and emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1983. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:861–866.
- Linde, C., O. Holmberg, and G. Astrom. 1980. The interference between coagulase negative staphylococci and *Corynebacterium bovis* and the common udder pathogens in the lactating cow. *Nord. Vet. Med.* 32:552–558.
- Lipsky, B. A., A. C. Goldberger, L. S. Tompkins, and J. J. Plorde. 1982. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis.* 4:1220–1235.
- McKean, S., J. Davies, and R. Moore. 2005. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect.* 7:1352–1363.
- McKean, S. C., J. K. Davies, and R. J. Moore. 2007a. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* 153:2203–2211.
- McKean, S. C., J. K. Davies, and R. J. Moore. 2007b. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43°C. *Res. Microbiol.* 158:279–286.
- McNamara, P. J., G. A. Bradley, and J. G. Songer. 1994. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12:921–930.
- McNamara, P. J., W. A. Cuevas, and J. G. Songer. 1995. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 156:113–118.
- Miers, K. C., and W. B. Ley. 1980. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in the horse: study of 117 clinical cases and consideration of etiopathogenesis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177:250–253.
- Moore, R. J., L. Rothel, J. Krywult, A. J. Radford, K. Lund, and A. L. Hodgson. 1999. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* 18:487–497.
- Moore, R. J., D. J. Stewart, K. Lund, and A. L. Hodgson. 2001. Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic

- protease antigen. FEMS Microbiol. Lett. 194:193–196.
- Muckle, C. A., and C. L. Gyles. 1983. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. Am. J. Vet. Res. 44:1149–1153.
- Muckle, C. A., P. I. Menzies, Y. Li, Y. T. Hwang, and M. van Wesenbeeck. 1992. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet. Microbiol. 30:47–58.
- Nagaraja, T. G., and K. F. Lechtenberg. 2007. Liver abscesses in feedlot cattle. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 23:351–369.
- Narayanan, S., T. G. Nagaraja, N. Wallace, J. Staats, M. M. Chengappa, and R. D. Oberst. 1998. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. Am. J. Vet. Res. 59:271–276.
- Nishibori, T., H. Xiong, I. Kawamura, M. Arakawa, and M. Mitsuyama. 1996. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. Infect. Immun. 64:3188–3195.
- Paton, M. W., S. S. Sutherland, I. R. Rose, R. A. Hart, A. R. Mercy, and T. M. Ellis. 1995. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. Aust. Vet. J. 72:266–269.
- Paton, M. W., S. B. Walker, I. R. Rose, and G. F. Watt. 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Aust. Vet. J. 81:91–95.
- Paule, B. J., V. Azevedo, L. F. Regis, R. Carminati, C. R. Bahia, V. L. Vale, et al. 2003. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity, and antigen recognition by Western blotting. Vet. Immunol. Immunopathol. 96:129–139.
- Paule, B. J., R. Meyer, L. F. Moura-Costa, R. C. Bahia, R. Carminati, L. F. Regis, et al. 2004. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Protein Expr. Purif. 34:311–316.
- Peel, M. M., G. G. Palmer, A. M. Stacpoole, and T. G. Kerr. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia, and review. Clin. Infect. Dis. 24:185–191.
- Pepin, M., J. J. Fontaine, P. Pardon, J. Marly, and A. L. Parodi. 1991. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. Vet. Microbiol. 29:123–134.
- Pepin, M., J. C. Pittet, M. Olivier, and I. Gohin. 1994. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. J. Leukoc. Biol. 56:666–670.
- Pepin, M., H. F. Seow, L. Corner, J. S. Rothel, A. L. Hodgson, and P. R. Wood. 1997. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. Vet. Res. 28:149–163.
- Pietrocola, G., V. Valtulina, S. Rindi, B. H. Jost, and P. Speziale. 2007. Functional and structural properties of CbpA, a collagen-binding protein from *Arcanobacterium pyogenes*. Microbiology 153:3380–3389.
- Piontkowski, M. D., and D. W. Shivvers. 1998. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212:1765–1768.
- Poonacha, K. B., and J. M. Donahue. 1995. Abortion in a mare associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7:563–564.
- Ramos, C. P., G. Foster, and M. D. Collins. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:46–53.
- Riegel, P., R. Ruimy, D. de Briel, G. Prevost, F. Jehl, R. Christen, et al. 1995. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. FEMS Microbiol. Lett. 126:271–276.
- Rosado, C. J., S. Kondos, T. E. Bull, M. J. Kuiper, R. H. Law, A. M. Buckle, et al. 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. Cell. Microbiol. 10:1765–1774.
- Ruiz, N., B. Wang, A. Pentland, and M. Caparon. 1998. Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A streptococci. Mol. Microbiol. 27:337–346.
- Rumbaugh, G. E., B. P. Smith, and G. P. Carlson. 1978. Internal abdominal abscesses in the horse: a

- study of 25 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172:304–309.
- Schuhegger, R., M. Linder Mayer, R. Kugler, J. Heesemann, U. Busch, and A. Sing. 2008. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:2822–2823.
- Selim, S. A. 2001. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B.* 48:241–258.
- Semambo, D. K., T. R. Ayliffe, J. S. Boyd, and D. J. Taylor. 1991. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *Actinomyces pyogenes*. *Vet. Rec.* 129:12–16.
- Seto, Y., T. Komiya, M. Iwaki, T. Kohda, M. Mukamoto, M. Takahashi, et al. 2008. Properties of corynebacter attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61:116–122.
- Silva, E., M. Gaivao, S. Leitao, B. H. Jost, C. Carneiro, C. L. Vilela, et al. 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet. Microbiol.* 132:111–118.
- Simmons, C. P., S. J. Dunstan, M. Tachedjian, J. Krywult, A. L. Hodgson, and R. A. Strugnell. 1998. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66:474–479.
- Simmons, C. P., A. L. Hodgson, and R. A. Strugnell. 1997. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 65:3048–3056.
- Songer, J. G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5:156–161.
- Songer, J. G., K. Beckenbach, M. M. Marshall, G. B. Olson, and L. Kelley. 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49:223–226.
- Spier, S. J., C. M. Leutenegger, S. P. Carroll, J. E. Loye, J. B. Pusterla, T. E. Carpenter, et al. 2004. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Am. J. Vet. Res.* 65:829–834.
- Stoops, S. G., H. W. Renshaw, and J. P. Thilsted. 1984. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. *Am. J. Vet. Res.* 45:557–561.
- Sutherland, S. S., R. A. Hart, and N. B. Buller. 1996. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 49:1–9.
- Tachedjian, M., J. Krywult, R. J. Moore, and A. L. Hodgson. 1995. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* 13:1785–1792.
- Takahashi, T., Y. Mori, H. Kobayashi, M. Ochi, N. Kikuchi, and T. Hiramune. 1997. Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16S rDNA sequence. *Microbiol. Immunol.* 41:649–655.
- Takeuchi, S., R. Azuma, Y. Nakajima, and T. Suto. 1979. Diagnosis of *Corynebacterium pyogenes* infection in pigs by immunodiffusion test with protease antigen. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo) 19:77–82.
- Takeuchi, S., T. Kaidoh, and R. Azuma. 1995. Assay of proteases from *Actinomyces pyogenes* isolated from pigs and cows by zymography. *J. Vet. Med. Sci.* 57:977–979.
- Tambourgi, D. V., M. De Sousa Da Silva, S. J. Billington, R. M. Goncalves De Andrade, F. C. Magnoli, et al. 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* 107:93–101.
- Tashjian, J. J., and S. G. Campbell. 1983. Interaction between caprine macrophages and corynebacterium pseudotuberculosis: an electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.* 44:690–693.
- Tauch, A., O. Kaiser, T. Hain, A. Goesmann, B. Weisshaar, A. Albersmeier, et al. 2005. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* 187:4671–4682.
- Tauch, A., E. Trost, A. Tilker, U. Ludwig, S. Schneiker, A. Goesmann, et al. 2008. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 136:11–21.
- Tejedor, M. T., J. L. Martin, P. Lupiola, and C. Gutierrez. 2000. Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. *Can. Vet. J.* 41:126–127.
- Vanechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschaegen, A. De Rouck, et al. 1995.

- Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. Res. Microbiol. 146:633–641.
- Walker, J., H. Jackson, M. R. Brandon, and E. Meeusen. 1991. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. Clin. Exp. Immunol. 86:13–18.
- Walker, J., H. J. Jackson, D. G. Eggleton, E. N. Meeusen, M. J. Wilson, and M. R. Brandon. 1994. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. Infect. Immun. 62:2562–2567.
- Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16:41–66.
- Williamson, L. H. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 17:359–371.
- Won, Y. S., E. S. Jeong, H. J. Park, C. H. Lee, K. H. Nam, H. C. Kim, et al. 2007. Upregulation of galectin-3 by *Corynebacterium kutscheri* infection in the rat lung. Exp. Anim. 56:85–91.
- Yanagawa, R., and E. Honda. 1978. *Corynebacterium pilosum* and *Corynebacterium cystitidis*, two new species from cows. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:209–216.
- Yeruham, I., Y. Braverman, N. Y. Shpigel, A. Chizov-Ginzburg, A. Saran, and M. Winkler. 1996. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. I. Vet. Q. 18:87–89.
- Yeruham, I., D. Elad, S. Friedman, and S. Perl. 2003a. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. Epidemiol. Infect. 131:947–955.
- Yeruham, I., D. Elad, S. Perl, and A. Ram. 2003b. Necrotic-ulcerative dermatitis on the heels of heifers in a dairy herd infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet. Rec. 152:598–600.
- Yeruham, I., D. Elad, M. Van-Ham, N. Y. Shpigel, and S. Perl. 1997. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. Vet. Rec. 140:423–427.
- Yeruham, I., S. Friedman, S. Perl, D. Elad, Y. Berkovich, and Y. Kalgard. 2004. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. Vet. Dermatol. 15:315–320.

UNCORRECTED

9.3 Anexo III – Currículo Lattes

Luis Gustavo Carvalho Pacheco
Curriculum Vitae

Fevereiro/2010

Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome: Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Nome em citações bibliográficas: **PACHECO, L. G. C.**; Pacheco, LGC; Pacheco, Luis GC; Pacheco, L.G.C.; Pacheco, Luis G.C.

Sexo: masculino

Nascimento: 12/06/1982 - Sete Lagoas/MG - Brasil

Endereço profissional: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral. Avenida Antônio Carlos, 6627, Laboratório de Genética Celular e Molecular, Bloco Q3, 259, Pampulha, Belo Horizonte. 31270-901, MG - Brasil

Endereços eletrônicos: lpacheco@icb.ufmg.br; lgcpacheco@gmail.com

Formação acadêmica e treinamento

Doutorado em Bioquímica e Imunologia

Período: 2006 - 2010

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil, com período sanduíche em University of Warwick (Orientador : Crhistopher Dowson)

Título: Avaliação do papel dos fatores sigma ECF da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na virulência, na resistência ao estresse e na regulação da expressão gênica

Orientador: Sérgio Costa Oliveira

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Mestrado em Genética

Período: 2004 – 2006

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Título: Desenvolvimento de um ensaio de PCR multiplex para identificação de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e rápida detecção desta bactéria em amostras clínicas

Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação em Ciências Biológicas Diurno, Bacharelado em Genética

Período: 2000 – 2003

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Título: Administração oral de vacina de DNA com o gene Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando como carreadora linhagem atenuada de *Salmonella*.

Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Cursos de extensão ou treinamento

1. Advanced Course: Proteomics Bioinformatics. The Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge -UK, EMBL-EBI, Inglaterra. Bolsista do(a): The Wellcome Trust

2. Curso em Road Show SELDI-TOF. BioRad Laboratórios, BIO-RAD, Brasil

3. Curso em Lactic and Probiotic Bacteria New Technological Tendencies. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

4. Curso em Bio-Computing. Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil

Produção científica

Publicação de capítulo de livro como co-autor

1. PENA, R. R., DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, MIYOSHI, Anderson, Azevedo, V. Emprego de Bactérias Lácticas Geneticamente Modificadas na Indústria de Laticínios. In: Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais. Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, p. 187- 211.

2. DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, Coelho, KS, Rocha, C, Lobo, FP, FRANCO, G. R., MEYER, R., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco. Sequenciamento do genoma da *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela rede genoma de Minas Gerais: impactos esperados na ovino e caprinocultura nacional. In: Biotecnologia e saúde animal. Ed. Viçosa: Editora UFRV, 2007, p. 111-150.

3. DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, GUIMARAES, V., MIYOSHI, Anderson, FREITAS, D., AZEVEDO, Vasco. Vacinas de DNA: novas vias de administração. In: Alimentos Transgênicos: saúde e segurança. Ed. Viçosa-MG: Editora Folha de Viçosa, 2005, p. 193-210.

4. MIYOSHI, Anderson, FREITAS, D., DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, GUIMARAES, V., LANGELLA, P., AZEVEDO, Vasco. Bactérias Lácticas. In: Biotecnologia e Saúde. Ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda, 2004, p. 201-232.

Publicação de trabalho científico como autor

1. **PACHECO, L. G. C.**, MATI, V. L. T., Castro, TLP, DORELLA, Fernanda Alves, OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, Anderson, Melo, A. L., AZEVEDO, Vasco
Oral immunization with *Salmonella* harboring a Sm14-based DNA vaccine does not protect mice against *Schistosoma mansoni* infection. Parasitology International., v.57, p.506 - 508, 2008.

2. **PACHECO, L. G. C.**, PENA, R. R., Castro, TLP, DORELLA, Fernanda Alves, BAHIA, R. C., CARMINATI, R., FROTA, M. N. L., OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., ALVES, F. S. F., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology., v.56, p.480 - 486, 2007.

3. **PACHECO, L. G. C.**, ZUCCONI, Eder, MATI, V. L. T., MUIINHOS, R.G., MIYOSHI, Anderson, OLIVEIRA, S. C., Melo, A. L., AZEVEDO, Vasco
Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis.. Acta Tropica., v.95, p.132 - 142, 2005.

4. **PACHECO, L. G. C.**, ZUCCONI, Eder, Melo, A. L., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, Vasco
Salmonella como vetor de vacinas vivas orais. Revista de Ciências Médicas e Biológicas., v.3, p.115 - 123, 2004.

Publicação de trabalho científico como co-autor

1. DIAS, A. A. S. O., SILVA, F. C., PEREIRA, G. A., SOUZA, M. C., CAMELLO, TCF, DAMASCENO, J. A., **Pacheco, Luis G.C.**, Miyoshi, A, Azevedo, Vasco A., Hirata, Raphael, BOAS, M.H.S.V., Mattos-Guaraldi, AL
Corynebacterium ulcerans Isolated from an Asymptomatic Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil. Vector Borne and Zoonotic Diseases, v.10, p. 1 - 6, 2010.
2. SILVA, V. D., PROSDOCIMI, F., MORAES, P., DORELLA, Fernanda Alves, **Pacheco, LGC**, ORTEGA, J. M., TEIXEIRA, S., Meyer, Roberto, MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Microbiological Research., v.00, p.2 - 9, 2009.
3. SEYFFERT, N., Guimarães, A.S., **Pacheco, L.G.C.**, Portela, R.W., Bastos, B.L., Dorella, F.A., Heinemann, M.B., Lage, A.P., Gouveia, A.M.G., MEYER, R., Miyoshi, A, Azevedo, V
High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in Veterinary Science, p.50 - 55, 2010.
4. Dorella, Fernanda A, **Pacheco, LGC**, Seyffert, Núbia, PORTELA, R. W., MEYER, R., Miyoshi, A, Azevedo, V
Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. Expert Review of Vaccines, v.8, p.205 - 213, 2009.
5. Mattos-Guaraldi, AL, Sampaio, JLM, Santos, CS, Pimenta, FP, Pereira, GA, **PACHECO, L. G. C.**, Miyoshi, A, Azevedo, V, Moreira, LO, Gutierrez, FL, Costa, JLF, Costa-Filho, R, Damasco, PV, Camello, TCF, Hirata Jr, R
First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.103, p.396 - 400, 2008.
6. D'AFONSECA, V., MORAES, P., DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, MEYER, R., PORTELA, R. W., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. Genetics and Molecular Research., v.7, p.252 - 260, 2008.
7. DORELLA, Fernanda Alves, ESTEVAM, E. M., **PACHECO, L. G. C.**, LANA, UGP, Guimarães, CT, OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. Applied and Environmental Microbiology, v.72, p.7368 - 7372, 2006.
8. DORELLA, Fernanda Alves, **PACHECO, L. G. C.**, OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary Research., v.37, p.201 - 218, 2006.
9. CELESTINO, Patricia Borges Santos, CARVALHO, Lydston Rodrigues de, FREITAS, Leandro Martins de, DORELLA, Fernanda Alves, MARTINS, Natalia Florencio, **PACHECO, L. G. C.**, MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
Update of microbial genome programs for bacteria and archaea. Genetics And Molecular Research., v.3, p.421 - 431, 2004.

Resumos

1. CASTRO, T. L. P. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; DORELLA, F. A. ; PINTO, A. C. ; MORAES, P. M. R. O. ; RIBEIRO, D. ; BÜCKER, D. H. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta ao estresse oxidativo. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.
2. BÜCKER, D. H. ; RIBEIRO, D. ; **PACHECO, L. G. C.** ; DORELLA, F. A. ; CASTRO, T. L. P. ; SEYFFERT, N. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em amostras clínicas de animais assintomáticos utilizando a técnica de PCR em tempo real. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.
3. SEYFFERT, N. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SILVA, W. M. ; ALVES, L. M. C. ; SANTOS, A. V. ; RODRIGUES, R. M. ; CASTRO, T. L. P. ; PIMENTA, A. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Caracterização de proteínas secretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.
4. SILVA, W. M. ; SEYFFERT, N. ; ALVES, L. M. C. ; **PACHECO, L. G. C.** ; DORELLA, F. A. ; CASTRO, T. L. P. ; GUIMARÃES, L. C. ; SILVA, A. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Análise comparativa dos secretomas de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.
5. RIBEIRO, D. ; CASTRO, T. L. P. ; BÜCKER, D. H. ; **PACHECO, L. G. C.** ; DORELLA, F. A. ; LUVIZOTTO, M. C. R. ; AZEVEDO, V. Métodos de diagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.
6. SILVA, V. D. ; MORAES, P. ; Dorella, Fernanda A ; **Pacheco, LGC** ; CERQUEIRA, P. G. ; SEYFFERT, N. ; Castro, TLP ; PROSDOCIMI, F. ; PENA, I. ; OLIVEIRA, S. C. ; ORTEGA, J. M. ; Meyer, Roberto ; Miyoshi, A ; Azevedo, V. Caracterização do conteúdo gênico e organização genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - BA. Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.
7. **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; SEYFFERT, N. ; DORELLA, F. A. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; SOARES, S. C. ; BÜCKER, D. H. ; MORAES, P. M. R. O. ; CERQUEIRA, P. G. ; SILVA, W. M. ; RIBEIRO, D. ; SANTOS, S. G. ; FARIAS, L. M. ; CARVALHO, M. A. R. ; PIMENTA, A. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; OLIVEIRA, S. C. ; AZEVEDO, V. Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: 26ª Reunião de Genética de microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de microrganismos, 2008.
8. DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; SOARES, S. C. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: 26ª Reunião de Genética de microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de microrganismos, 2008.
9. SOARES, S. C. ; PINTO, A. C. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; HIRATA, R. Jr. ; AZEVEDO, V. ;

MIYOSHI, A. . Análise das ilhas de patogenicidade de *Corynebacterium diptheriae* por PCR2 (Plasticity of chromossome revealed by long range - Polymerase chain reaction). In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.

10. SEYFFERT, N. ; **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; SOARES, S. C. ; SANTOS, S. G. ; DAFONSECA, V. ; CARVALHO, M. A. R. ; FARIAS, L. M. ; OLIVEIRA, S. C. ; PIMENTA, A. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Análise imunoproteômica do secretoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para fins diagnósticos. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.

11. SILVA, W. M. ; SEYFFERT, N. ; SANTOS, B. M. N. ; PRUDENCIO, C. R. ; **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; PORTELA, R. W. ; SOARES, S. C. ; MAHECHA, G. A. B. ; GOULART, L. R. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. ; AZEVEDO, V. . Uso de phage display na seleção de peptídeos para o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.

12. CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; DORELLA, F. A. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SOARES, S. C. ; CASTRO, T. L. P. ; DAFONSECA, V. ; SEYFFERT, N. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a identificação de promotores através da expressão de gfp. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.

13. **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; SEYFFERT, N. ; DORELLA, F. A. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; SOARES, S. C. ; BÜCKER, D. H. ; MORAES, P. M. R. O. ; CERQUEIRA, P. G. ; SILVA, W. M. ; RIBEIRO, D. ; SANTOS, S. G. ; FARIAS, L. M. ; CARVALHO, M. A. R. ; PIMENTA, A. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; OLIVEIRA, S. C. ; AZEVEDO, V. Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

14. DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; SOARES, S. C. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

15. SOARES, S. C. ; PINTO, A. C. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; HIRATA, R. Jr. ; AZEVEDO, V. ; MIYOSHI, A. Plasticidade genômica de *Corynebacterium diptheriae*: implicações na virulência. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

16. SEYFFERT, N. ; **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; SOARES, S. C. ; MORAES, P. M. R. O. ; D'Afonseca, V. ; CARVALHO, M. A. R. ; FARIAS, L. M. ; OLIVEIRA, S. C. ; PIMENTA, A. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Integração da genômica e proteômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o imunodiagnóstico da linfadenite caseosa. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

17. CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; DORELLA, F. A. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SOARES, S. C. ; CASTRO, T. L. P. ; DAFONSECA, V. ; SEYFFERT, N. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ;

AZEVEDO, V. Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a identificação de promotores através da expressão de gfp. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

18. SILVA, W. M. ; SEYFFERT, N. ; SANTOS, B. M. N. ; PRUDENCIO, C. R. ; **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; PORTELA, R. W. ; SOARES, S. C. ; MAHECHA, G. A. B. ; GOULART, L. R. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. ; AZEVEDO, V. Identificação de epítomos da superfície de fagos para o imunodiagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

19. DAFONSECA, V. ; MORAES, P. M. R. O. ; DORELLA, F. A. ; **PACHECO, L. G. C.** ; ALMEIDA, S. ; PINTO, A. C. ; SANTOS, A. R. ; CERQUEIRA, P. G. ; SEYFFERT, N. ; CASTRO, T. L. P. ; SOARES, S. C. ; PROSDOCIMI, F. ; PENA, I. ; ORTEGA, J. M. ; OLIVEIRA, S. C. ; OLIVEIRA, G. C. ; COSER, E. M. ; OLIVEIRA, L. M. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Caracterização do conteúdo gênico e organização genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - Bahia. Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

20. CERQUEIRA, P. G.; PINTO, A. C.; DORELLA, F. A.; **PACHECO, L. G. C.**; SOARES, S. C.; CASTRO, T. L. P.; DAFONSECA, V.; SEYFFERT, N.; MEYER, R. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco. Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para identificação de promotores através da expressão GFP. In: I Encontro de Alunos e Ex-alunos do PG Genética - Professora Cleusa Graça da Fonseca, 2008, Belo Horizonte. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG, 2008.

21. **PACHECO, L. G. C.** ; CASTRO, T. L. P.; SEYFFERT, N.; DORELLA, F. A. et al. Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: I Encontro de Alunos e Ex-alunos do PG Genética - Professora Cleusa Graça da Fonseca, 2008, Belo Horizonte. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG, 2008.

22. SOARES, S. C. ; PINTO, A. C. ; DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; HIRATA, R. Jr. ; AZEVEDO, V. ; MIYOSHI, A. Plasticidade genômica de *Corynebacterium diphtheriae*: implicações na virulência. In: I Encontro de Alunos e Ex-alunos do PG Genética - Professora Cleusa Graça da Fonseca, 2008, Belo Horizonte. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG, 2008.

23. DORELLA, F. A. ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; SEYFFERT, N. ; PINTO, A. C. ; DAFONSECA, V. ; CASTRO, T. L. P. ; SOARES, S. C. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. Analysis of vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: I Encontro de Alunos e Ex-alunos do PG Genética - Professora Cleusa Graça da Fonseca, 2008, Belo Horizonte. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG, 2008.

24. Coelho, KS ; **PACHECO, L. G. C.** ; FONSECA, C. T. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco. The Immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* HSP60-based Protein and DNA Vaccines. In: 13th International Congress of Immunology, 2007, Rio de Janeiro. Caderno de Resumos do ImmunoRio 2007, 2007.

25. CASTRO, T. L. P. ; EUSTACHIO, R. R. ; **PACHECO, L. G. C.** ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Desenvolvimento de um ensaio de PCR-multiplex para identificação de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: XVI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, Belo Horizonte - MG. Anais da XVI Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2007.

26. EUSTACHIO, R. R. ; CASTRO, T. L. P. ; **PACHECO, L. G. C.** ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Desenvolvimento de um ensaio de PCR-multiplex para rápida detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em amostras clínicas de ovinos e caprinos infectados. In: XVI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, Belo Horizonte - MG. Anais da XXI Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2007.
27. DORELLA, Fernanda Alves ; CERQUEIRA, P. G. ; **PACHECO, L. G. C.** ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
28. Coelho, KS ; SEYFFERT, N. ; **PACHECO, L. G. C.** ; FONSECA, C. T. ; MEYER, R. ; OLIVEIRA, S. C. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Avaliação do potencial imunogênico do antígeno HSP60 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o desenvolvimento de vacinas contra a linfadenite caseosa.. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
29. SILVA, V. D. ; MORAES, P. ; **PACHECO, L. G. C.** ; DORELLA, Fernanda Alves ; CAPANEMA, E. R. ; PENA, I. ; ORTEGA, J. M. ; MEYER, R. ; CORREA-OLIVEIRA, G. ; OLIVEIRA, S. C. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Partial genome sequence through GSS analyses and comparative genomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* the ethiological agent of caseous lymphadenitis disease.. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
30. Castro, TLP ; **PACHECO, L. G. C.** ; VALADARES, M. ; SEYFFERT, N. ; CAMPOS, A. ; NUNES, M. ; PIMENTA, A. ; FRANCO, G. R. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Caracterização inicial do secretoma da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
31. **PACHECO, L. G. C.** ; Castro, TLP ; DORELLA, Fernanda Alves ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Avaliação do papel dos fatores sigma ECF da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse ambiental.. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
32. SOUZA, MA ; Melo, A. L. ; PENA, R. R. ; **PACHECO, L. G. C.** ; BARBOSA, FS ; PINTO, HA ; AZEVEDO, Vasco . Caracterização morfológica e molecular da larva Echinostoma oriunda de Iguatama, Minas Gerais, Brasil. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária / II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, 2006, Ribeirão Preto. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária / II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, 2006.
33. MATI, V. L. T. ; **PACHECO, L. G. C.** ; ZUCCONI, Eder ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco ; Melo, A. L. . IMUNIZAÇÃO ORAL DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO SALMONELLA ENTERICA VAR. TYPHIMURIUM ATENUADA EXPRESSANDO SM14: ASPECTOS DA OVIPOSIÇÃO DO SCHISTOSOMA MANSONI. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005, Florianópolis-SC. Caderno de resumos do XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005.
34. **PACHECO, L. G. C.** ; PENA, R. R. ; Castro, TLP ; DORELLA, Fernanda Alves ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . A MULTIPLEX-PCR ASSAY FOR THE SPECIFIC DETECTION OF *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* IN CLINICAL SAMPLES.. In: III Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia da UFMG, 2005, Belo Horizonte. Anais do III Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia da UFMG, 2005.

35. **PACHECO, L. G. C.** ; ZUCCONI, Eder ; MUIINHOS, R.G. ; Melo, A. L. ; OLIVEIRA, S. C. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . ORAL VACCINATION WITH A LIVE ATTENUATED SALMONELLA STRAIN EXPRESSING SM14 INDUCED PARTIAL PROTECTION AGAINST SCHISTOSOMIASIS.. In: X International Symposium on Schistosomiasis, 2005, Belo Horizonte. Analls of the X International Symposium on Schistosomiasis, 2005.

36. MATI, V. L. T. ; **PACHECO, L. G. C.** ; MIYOSHI, Anderson ; OLIVEIRA, S. C. ; AZEVEDO, Vasco ; Melo, A. L. . GRANULOMA ANALYSIS OF ANTI-PATHOLOGY EFFECTS ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL VACCINES AGAINST SCHISTOSOMIASIS: APLICATION TO TWO Salmonella-BASED ORAL VACCINES. In: X International Symposim on Schistosomiasis, 2005, Belo Horizonte. Analls of the X International Symposim on Schistosomiasis, 2005.

37. **PACHECO, L. G. C.** ; PENA, R. R. ; Castro, TLP ; DORELLA, Fernanda Alves ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . Development of a new multiplex-PCR assay for the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from clinical samples. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP. Caderno de Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.

38. DORELLA, Fernanda Alves ; ESTEVAM, E. M. ; **PACHECO, L. G. C.** ; Guimarães, CT ; LANA, UGP ; OLIVEIRA, S. C. ; MIYOSHI, Anderson ; AZEVEDO, Vasco . In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP. Caderno de Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.

Participação de projetos

Produção técnica

Co-autoria de artigo de divulgação publicado em revista

1. RIBEIRO, D., **Pacheco, L.G.C.**, Miyoshi, A, Azevedo, V
Linfadenite Caseosa e o crescimento da caprino e ovinocultura no país. Revista Cabras e Ovelhas. 2008.

Patente registrada como primeiro autor

1. **PACHECO, L. G. C.**, Castro, TLP, MEYER, R., MIYOSHI, Anderson, AZEVEDO, Vasco
REAGENTES, INICIADORES E KIT PARA DIAGNÓSTICO - PI ND211, 2007.
Patente: Privilégio de Inovação n.PI ND211, REAGENTES, INICIADORES E KIT PARA DIAGNÓ. 16 de Outubro de 2006 (Depósito); 15 de Outubro de 2007 (Concessão).

Atividades de ensino e transferência de tecnologia

Atividade docente

1. Fundação Universidade Federal do Tocantins - UFT
Vínculo: professor visitante
Curso de Especialização Lato sensu – Microbiologia, Fundamentos e Biotecnologia.
2. Universidade Federal de Sergipe – UFS
Vínculo: professor visitante

Curso CBAB/CNPq: Técnicas Moleculares Aplicadas ao Diagnóstico de Doenças Infecto Contagiosas Humanas e Animais.

3. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Vínculo: professor tutor

Curso de licenciatura em ciências Biológicas, modalidade a distância.

4. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Vínculo:palestrante

Curso Tópicos especiais em genética e evolução I – bioinformática e biotecnologia de microrganismos

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)