

Expressão gênica de fatores de virulência de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o seu papel na patogênese da Linfadenite caseosa

Gene expression of *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence factors and their role in the pathogenesis of caseous lymphadenitis

Expresión génica de factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y su papel en la patogenia de la linfadenitis caseosa

Recebido: 03/10/2022 | Revisado: 16/10/2022 | Aceitado: 17/10/2022 | Publicado: 21/10/2022

Jefferson Ivan Corrêa¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5801-7759>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: jefivanco@gmail.com

José Tadeu Raynal Rocha Filho²

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2771-0235>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: jtraynal@hotmail.com

Bruno Lopes Bastos³

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8128-1657>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: bastosbl@gmail.com

Daniel Menezes Bonaspetti⁴

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-1581>
Centro Universitário UNIFAS, Brasil
E-mail: dmbonaspetti@gmail.com

Júlia Maria Guimarães Matos⁴

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0996-5370>
Centro Universitário UNIFAS, Brasil
E-mail: juliamgm99@gmail.com

Ezequiel Fabiane Spanholi⁵

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6199-397X>
União Metropolitana de Educação e Cultura, Brasil
E-mail: ezequielspanholi@gmail.com

Antônio Pedro Fróes de Farias¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2625-9470>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: froes_pedro@hotmail.com

Lília Ferreira De Moura Costa¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0462-3195>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: lmouracosta@gmail.com

Soraya Castro Trindade¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7125-9114>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

Roberto José Meyer Nascimento¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4727-4805>
Universidade Federal da Bahia, Brasil
E-mail: rmeyer@ufba.br

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da linfadenite caseosa (LC), uma doença infecciosa, granulomatosa, crônica e debilitante que acomete diversos animais, entre eles, caprinos, ovinos, bovinos, equinos,

¹ Pesquisador do LABIMUNO (Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular) / Universidade Federal da Bahia.

² Professor da UNIME/ Lauro de Freitas, Pesquisador do LABIMUNO (Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular) / UFBA

³ Professor Adjunto do Instituto Multidisciplinar em Saúde Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia (IM-CAT/UF, Vitória da Conquista

⁴ Estudante do 12º semestre de Medicina do Centro Universitário UNIFAS / UNIME, Lauro de Freitas, Bahia

⁵ Médico e Professor da UNIME/ Lauro de Freitas, Bahia, Brasil

camelídeos e, mais raramente, seres humanos. O grupo denominado CMNR, composto por bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, está envolvido em diversas patologias importantes, tanto na medicina humana quanto na veterinária. O foco dos estudos com o agente etiológico da LC tem sido em relação ao diagnóstico, epidemiologia, profilaxia, terapêutica e genômica. Embora a doença seja estudada desde o início do século XX, de forma similar àquelas causadas por outras entidades bacterianas, o levantamento acerca dos mecanismos patofisiológicos e de evasão deste agente são praticamente desconhecidos. Os fatores de virulência do agente etiológico da linfadenite caseosa são pouco numerosos, mas o sequenciamento pioneiro do genoma de uma cepa isolada de um paciente humano, *C. pseudotuberculosis* FRC41, permitiu a identificação e anotação de diversos genes codificadores de proteínas cujas características fisiológicas se ajustam à definição de fator de virulência. Em *Mycobacterium tuberculosis*, a cinase PknG controla o metabolismo da glutamina, mas pode ser secretada dentro de fagossomos de macrófagos, interferindo na maturação destas organelas. A mesma enzima existe em outros representantes da subordem *Corynebacterineae*, incluindo *Corynebacterium pseudotuberculosis* outros antígenos já foram descritos e suas estão a ser elucidadas. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão a cerca dos fatores de virulência do *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Fatores de virulência; Imunidade.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is the causative agent of caseous lymphadenitis (CL), an infectious, granulomatous, chronic and debilitating disease that affects several animals, including goats, sheep, cattle, horses, camelids and, more rarely, humans. The group called CMNR, composed of bacteria of the genera *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus*, is involved in several important pathologies, both in human and veterinary medicine. The focus of studies with the etiologic agent of CL has been in relation to diagnosis, epidemiology, prophylaxis, therapy and genomics. Although the disease has been studied since the beginning of the 20th century, similarly to those caused by other bacterial entities, the survey about the pathophysiological and evasion mechanisms of this agent are practically unknown. The virulence factors of the etiologic agent of caseous lymphadenitis are few, but the pioneering sequencing of the genome of a strain isolated from a human patient, *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41, allowed the identification and annotation of several protein-coding genes whose physiological characteristics fit definition of virulence factor. In *Mycobacterium tuberculosis*, PknG kinase controls glutamine metabolism, but it can be secreted into macrophage phagosomes, interfering with the maturation of these organelles. The same enzyme exists in other representatives of the suborder *Corynebacterineae*, including *C. pseudotuberculosis*, other antigens have already been described and their are being elucidated. In this context, the objective of this work was to carry out a review about the virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Virulence factors; Immunity.

Resumen

Corynebacterium pseudotuberculosis es el agente causal de la linfadenitis caseosa (LC), una enfermedad infecciosa, granulomatosa, crónica y debilitante que afecta a varios animales, incluidos caprinos, ovinos, bovinos, equinos, camélidos y, más raramente, humanos. El grupo denominado CMNR, compuesto por bacterias de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, está involucrado en varias patologías importantes, tanto en medicina humana como veterinaria. El enfoque de los estudios con el agente etiológico de CL ha estado relacionado con el diagnóstico, la epidemiología, la profilaxis, la terapia y la genómica. Aunque la enfermedad ha sido estudiada desde principios del siglo XX, al igual que las causadas por otras entidades bacterianas, el estudio sobre la fisiopatología y los mecanismos de evasión de este agente son prácticamente desconocidos. Los factores de virulencia del agente etiológico de la linfadenitis caseosa son pocos, pero la secuenciación pionera del genoma de una cepa aislada de un paciente humano, *C. pseudotuberculosis* FRC41, permitió identificar y anotar varios genes codificadores de proteínas cuyas características fisiológicas coinciden con la definición del factor de virulencia. En *Mycobacterium tuberculosis*, la cinasa PknG controla el metabolismo de la glutamina, pero puede secretarse en fagosomas de macrófagos, lo que interfiere con la maduración de estos orgánulos. La misma enzima existe en otros representantes del suborden *Corynebacterineae*, incluido *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ya se han descrito otros antígenos y se están dilucidando. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sobre los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Factores de virulência; Inmunidad.

1. Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa, uma zoonose de ocorrência mundial (Dorella et al., 2006, Bastos et al., 2012) que acomete diversos animais domésticos. Exibe alta prevalência no Brasil, especialmente nos rebanhos caprinos e ovinos do semiárido nordestino (Unanian et al., 1985).

A linfadenite caseosa é uma doença caracterizada pelo aparecimento de granulomas que evoluem para necrose caseosa nos linfonodos superficiais e internos, bem como em algumas vísceras, como pulmões e fígado (Arsenault et al., 2003; Sá et al., 2021). O seu controle se baseia fundamentalmente na vacinação dos animais, procedimento infelizmente ainda não consolidado, e adoção de medidas complementares concernentes à incorporação de novas unidades nos rebanhos, detecção precoce de animais infectados, segregação, tratamento ou eliminação de animais doentes, além de cuidados especiais no manuseio de rotina, (Guimarães et al., 2011; Windsor, 2011; Kumar et al., 2013).

Os componentes imunogênicos das vacinas comerciais mais eficazes são células vivas atenuadas de *C. pseudotuberculosis*, que podem estar eventualmente misturadas com formas inócuas (toxóides) da fosfolipase D, principal fator de virulência do *C. pseudotuberculosis* (Raynal, et al., 2018).

O sequenciamento pioneiro do genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 (Trost et al., 2010) permitiu a identificação de diversos genes muito envolvidos na virulência como, *cpp* (CP40), *nanH* (neuraminidase H), *rpfA* e *rpfB* (*resuscitation-promoting factors* A e B), *nor* (óxido nítrico redutase) e *dtsR2* (acetil-CoA carboxilase, subunidade beta, envolvida na biossíntese de ácidos micólicos) e *spaC* (proteína SpaC, componente de adesina). Além destes, destaca-se o gene *sodC*, que não figura no elenco dos potenciais determinantes de virulência da cepa sequenciada FRC41, mas cuja proteína superóxido-dismutase (SodC) é considerada fator de virulência por diversos pesquisadores (Tonello & Zornetta, 2012; Suo et al., 2012).

2. Desenvolvimento

O presente estudo foi delineado com o objetivo realizar uma revisão da literatura acerca dos genes e fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* em estudos empíricos publicados em periódicos. Trata-se de uma revisão narrativa da literatura, cuja busca foi efetuada nas bases de dados PubMed, Scielo. A pesquisa na literatura foi realizada em 2022, com uma estratégia livre, utilizando os termos “*Corynebacterium pseudotuberculosis*”, “fatores de virulência”, “patogênese”, “Linfadenite caseosa”. Os critérios de inclusão aplicados foram: artigos científicos publicados nos últimos 40 anos, nos idiomas inglês, português e espanhol. Os seguintes critérios de exclusão foram usados: artigos que não estavam relacionados ao tema proposto e artigos repetidos. A pesquisa revelou um total de 1115 artigos, sendo 716 no Pubmed e 691. Por fim, um total de 272 artigos foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, com base no título e no resumo.

3. Fatores de Virulência de *C. Pseudotuberculosis*

3.1 Fosfolipase D

Corynebacterium pseudotuberculosis secreta uma toxina denominada fosfolipase D, com função de esfingomielinase. A esfingomielina está presente em membranas celulares e, sob ação da fosfolipase D é clivada em colina livre e ceramida-fosfato, que permanece lidada à membrana (Carne & Onon, 1978). Esta exotoxina apresenta atividade hemolítica sinérgica com as enzimas colesterol-oxidase e fosfolipase C de *Rhodococcus equi* (Songer, 1997) e inibe o efeito hemolítico da β -hemolisina elaborada por *Staphylococcus aureus* (Songer et al., 1988).

A letalidade da toxina foi demonstrada em ruminantes por injeção parenteral (HSU & RENSHAW, 1985). A atividade da fosfolipase D está relacionada com a toxicidade observada em camundongos, atribuindo-se à toxina a necrose após injeção intradérmica (Goel & Singh, 1972), a formação de vesículas (Brogden et al., 1990), a inibição da migração e morte de neutrófilos (Yozwiak & Songer, 1993), assim como a aderência e indução de alterações na membrana de eritrócitos (Brogden et al., 1990). Devido a seu papel crítico na virulência e sua capacidade de funcionar como imunógeno protetor em diversas

espécies de animais, a fosfolipase D foi alvo de muitos estudos objetivando sua modificação para uso em vacinas e imunodiagnóstico (calderon et al., 2022). Em 1990, Hodgson e colaboradores e Songer e colaboradores clonaram e expressaram o gene da fosfolipase D (*pld*) em *Escherichia coli*. Em ambos os casos, a proteína foi expressa e a análise da mesma confirmou o valor do peso molecular, avaliado em trabalhos anteriores em cerca de 31-32 kDa.

Hodgson e colaboradores (1990) obtiveram um mutante de *C. pseudotuberculosis* com deleção do gene *pld*, a que denominaram Toxminus. Esta cepa foi usada para vacinar ovelhas por via subcutânea e os animais exibiram intensa resposta imune, tanto humoral como celular. A baixa capacidade dos animais de resistir a desafios posteriores com bactérias virulentas, mostrou que outros antígenos, diferentes da fosfolipase D, são importantes na resposta imune (Walker et al., 1994). Além disso, a observação de que as bactérias Toxminus não foram detectadas em gânglios internos estudados à necropsia após 8 semanas, indica que a presença da fosfolipase D é essencial para a persistência do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Na tentativa de obter uma vacina que pudesse ser usada oralmente em dose única, transformaram a cepa Toxminus com um plasmídeo (pTB253) contendo o gene mutante descrito anteriormente por Haynes e colaboradores (1992). Os pesquisadores observaram que a cepa transformada apresentou intensa diminuição da capacidade de secretar a proteína mutante, conforme dados obtidos com a técnica *western blotting*. Além disso, verificaram que animais vacinados oralmente com a cepa Toxminus não transformada apresentaram níveis muito baixos de proteção, em contraposição àqueles vacinados com esta mesma cepa por via subcutânea, e que o grupo de animais vacinados com Toxminus contendo o plasmídeo pTB253 não exibiu resposta imune humoral satisfatória.

Tachedjian e colaboradores (1995), estudando mutações no suposto centro catalítico e no domínio de ligação a íon metálico da enzima, constataram que as substituições de aminoácidos nestes locais levaram à intensa redução na secreção da toxina (apenas 40% em relação à versão selvagem). Em 1999 Hodgson e colaboradores voltaram à estratégia de vacinação de ovelhas com fosfolipase D inativada, desta vez com uma substituição de histidina na posição 20 por serina. Sob desafio com *C. pseudotuberculosis*, o índice de proteção foi de apenas 44%, comparado aos 95% obtidos com o toxóide clássico inativado com formalina (Hodgson et al., 1990).

A aplicação de vacina de DNA em ovinos foi descrita pela primeira vez por De Rose e colaboradores (2002). Os pesquisadores inocularam por via intramuscular (IM) um plasmídeo contendo uma forma atenuada do gene *pld* em fusão com o domínio Ig de CTLA-4. Sob desafio com o patógeno, apenas 45% dos animais exibiram proteção e a inoculação do mesmo produto por via subcutânea foi associada a índices desprezíveis de imunidade. Adicionalmente, foi observado que os animais imunes e vacinados por via IM apresentaram concentrações séricas mais elevadas de IgG2 do que os não imunes, sugerindo uma resposta Th1 símile nos primeiros (DE ROSE *et al.*, 2002).

Fontaine *et al.* (2006) produziram, a partir de uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* isolada no Reino Unido, três produtos vacinais: uma molécula recombinante da fosfolipase D, uma bacterina obtida por tratamento da cepa com formalina e a bacterina suplementada com o toxoide recombinante. O estudo sobre a imunização de ovinos com os três tipos de antígenos relata proteção absoluta com a vacina mista (mediante desafio experimental com a cepa homóloga), além de salientar a erradicação das bactérias patogênicas em todos os animais vacinados com a mesma.

3.2 Serina-protease de 40 kDa ou CP40

Serina-proteases fazem parte de um subgrupo da família das proteases e estão associadas a vários processos fisiológicos, tais como a coagulação do sangue, ativação do sistema complemento, degradação molecular, morte e cicatrização de tecido (Neurath, 1989), e são também envolvidas em ações pró-inflamatórias, principalmente por participarem da regulação de enzimas inflamatórias específicas (Safavi & Rostami, 2012).

Em 1994, Walker e colaboradores identificaram uma proteína de 40 kDa que apresentou poder protetor importante em ovelhas inoculadas com duas doses de 100 µg adsorvida em hidróxido de alumínio. A análise dos resultados de *western blotting* mostrou que o soro dos animais vacinados continha anticorpos que reconheceram apenas o antígeno de 40 kDa. Em 1995, Wilson, Brandon e Walker clonaram e sequenciaram o gene da referida proteína, caracterizando um produto de 379 aminoácidos que apresentou atividade proteolítica e inativação por inibidores específicos de serina proteases. Os pesquisadores propuseram o nome CP40 para designar esta serina-protease de *C. pseudotuberculosis*. A proteína CP40 é naturalmente secretada em culturas líquidas (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1995). No primeiro sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, Trost e colaboradores (2010) designaram o gene codificador da CP40 com a sigla *cpp*.

Droppa e colaboradores (2016) também observou a expressão desta molécula e relatou uma significativa capacidade de induzir a produção de anticorpos dependentes tanto de um estímulo Th1 como de Th2 em camundongos Balb/c e C57BL/6, relatou. É possível que esta enzima extracelular contribua para a virulência por causa de sua ação proteolítica (Trost et al., 2010), mas a atividade enzimática da CP40 não foi detectada em sobrenadantes de culturas e sua função *in vivo* não é conhecida (Wilson et al., 1995). Calderon e colaboradores (2022) e Barral e colaboradores (2019) evidenciaram um bom potencial na utilização da CP40 em teste imunodiagnóstico.

3.3 Neuraminidases bacterianas

Neuraminidases ou sialidases (EC 3.2.1.18) são glicosídeo-hidrolases que removem resíduos de ácido N-acetilneuramínico (NANA) de substratos diversos, tais como mucinas, glicoproteínas, gangliosídeos e alguns homopolímeros de NANA bacterianos (Arden et al., 1972). Têm sido apontadas como fatores de virulência de diversas espécies de bactérias destacando-se no gênero *Corynebacterium*: *C. diphtheriae* (Kim et al., 2010), *C. ulcerans* (Trost et al., 2011) e *C. pseudotuberculosis* (Trost et al., 2010). Algumas bactérias secretam a enzima, como micoplasmas (Bercic et al., 2008; May & Brown, 2009) e víbrios (Gennari et al., 2012), enquanto outras a apresentam ligada à sua superfície, como *Corynebacterium diphtheriae* (Kim et al., 2010).

Com base no tamanho, as neuraminidases bacterianas são divididas em dois grupos: as de pequeno tamanho, como as enzimas de *Salmonella spp* e *Clostridium perfringens*, com pesos moleculares em torno de 40 kDa, e as de grande tamanho, como as enzimas de *Clostridium tertium* e *Vibrio cholerae*, com pesos moleculares acima de 80 kDa. As neuraminidases de peso molecular mais elevado possuem domínios adicionais ligados ao domínio catalítico (Mizan et al., 2000).

A contribuição das neuraminidases para a patogênese bacteriana é variável. As sialidases podem ser usadas para transferir resíduos de ácidos siálicos de sialoglicanos para moléculasceptoras, por transglicosilação. Desta forma, alguns patógenos apresentam na sua superfície ácidos siálicos (Kim et al., 2010), geralmente com o propósito de escapar dos mecanismos imunes do hospedeiro. Uma espiroqueta da cavidade oral envolvida na patogenia da doença periodontal, *Treponema denticola*, apresenta uma neuraminidase ligada à sua membrana celular capaz de remover ácidos siálicos de sialoproteínas séricas humanas, usando-os tanto para sua nutrição como para evitar a deposição de complexos de ataque à membrana (MAC) derivados da ativação do sistema complemento (Kurniyati et al., 2013).

Paton e colaboradores (1993) sugeriram que as sialidases NanA e NanB de *Streptococcus pneumoniae* poderiam remover resíduos de ácidos siálicos de mucinas e glicanos da superfície do epitélio mucoso do hospedeiro expondo, desta forma, receptores celulares para adesão da bactéria. Em concordância com essa hipótese, Tong e colaboradores (2005) observaram, utilizando um modelo experimental de otite média em chinchilas, que cepas de pneumococos deficientes em NanA foram significativamente menos capazes de promover a colonização e persistirem na nasofaringe e ouvido médio dos animais.

As neuraminidases bacterianas também são usadas para remover resíduos de ácidos siálicos de moléculas sialiladas do hospedeiro, com a subsequente utilização dos mesmos na sua nutrição (Stafford et al., 2012; Kurniyati et al., 2013). Funções

adicionais destas enzimas são a participação na formação de biofilmes (Li et al., 2012) e modulação do sistema imune do hospedeiro vertebrado (Lewis & Lewis, 2012; Kurniyati et al., 2013).

3.4 Superóxido-dismutase C (SODC ou Cu/Zn-SOD)

Superóxido dismutases (EC 1.15.1.1) são óxido-redutases que catalisam a reação do íon superóxido O_2^- com íons H^+ , gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio conforme a reação: $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Estas enzimas são amplamente distribuídas em eucariotas e procariotas, funcionando para proteger as células de íons superóxido. Este íon faz parte do grupo das espécies químicas altamente reativas derivadas do oxigênio, designadas ROS (*reactive oxygen species*), resultantes do modo de vida aeróbico ou do surto respiratório que se segue à fagocitose de patógenos bacterianos (dahr, gupta & viridi, 2013).

As superóxido dismutases usam diferentes cofatores metálicos para executar a reação de óxido-redução e, em função deles, são classificadas da seguinte maneira: (i) SodA, as que usam manganês como cofator metálico (Mn-SOD); (ii) SodB, as que usam ferro como cofator (Fe-SOD); (iii) SodC, as que requerem cobre ou zinco como cofator (Cu/Zn-SOD) e (iv) SodN, as que usam níquel como cofator (Ni-SOD) (dahr, gupta & viridi, 2013). As SodA e SodB são geralmente encontradas no citoplasma das bactérias, ao passo que as Sod são encontradas no espaço periplasmático ou estão ancoradas por meio de lipídios na membrana celular (Dun et al., 2003).

Beaman e colaboradores (1983) estudaram uma superóxido dismutase tetramérica com 100 kDa secretada pela bactéria gram-positiva *Nocardia asteroides*. Em 1990 foi demonstrado que a enzima está ligada à superfície do microrganismo, atuando como antagonista dos efeitos antimicrobianos dos íons superóxido gerados pelo surto respiratório de leucócitos. (Beaman & Beaman, 1990). Cepas de *Salmonella choleraesuis* com deleções de *sodC1* e *sodC2* apresentaram dramática sensibilidade à presença simultânea de íons superóxido e óxido nítrico *in vitro* (Sansone et al., 2002). No entanto, Beaman e colaboradores (1985) consideraram que a resistência de *Nocardia asteroides* aos neutrófilos humanos foi devida, ao menos em parte, a uma superóxido dismutase não classificada. SodC também é encontrada em *Mycobacterium tuberculosis* (Wu et al., 1998; D'orazio et al., 2001; Rowland & Niederweis, 2012) e em bacilos gram-positivos como, por exemplo, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans* (Trost et al., 2010, 2012).

C. pseudotuberculosis contém uma SodA citoplasmática e uma SodC, cujas características estruturais indicam sua ligação à membrana celular. Embora se conheça o mecanismo de ação das Cu/Zn superóxido dismutases, não está esclarecido o papel que SodC pode desempenhar na patogenia desta bactéria.

3.5 Adesina SpaC

Os pelos adesivos de *C. pseudotuberculosis* FRC41 consistem de subunidades de: pilinas principais (SpaA, SpaD), pilinas secundárias (SpaB, SpaE) e proteínas nas extremidades (SpaC e SpaF), caracterizadas por motivos proteicos conservados (Trost et al., 2010). Dorella et al. (2006), usando a ferramenta TnFuZ desenvolvida por Gibson & Caparon (2002), detectaram 34 mutantes de inserção em genes codificadores de pelos e subunidades transportadoras, sugerindo que no mínimo um pelo do tipo SpaABC é expressado em *C. pseudotuberculosis* (trost et al., 2010). Os pelos aderentes de *C. diphtheriae* são covalentemente ligados à parede celular e podem mediar a adesão da bactéria a tecidos humanos. É possível que os pelos de *C. pseudotuberculosis* tenham um papel semelhante em seu hospedeiro animal. No momento, não há trabalhos relatando a expressão do gene *in vivo*, nem comparando sua expressão *in vitro* com aquela observada no abscesso do animal.

3.6 Proteínas cinases bacterianas – PKNG

É grande o número de proteínas cinases em cada espécie de organismo (Bullen et al., 2014; Moore & Gozani, 2014). O genoma humano, por exemplo, contém mais de 500 genes codificadores destas enzimas e eles representam cerca de 2% de todos os genes da espécie (Manning & Whyte, 2002). Os procariotas utilizam a fosforilação proteica reversível como mecanismo primário de transdução de sinais, para mediar tanto a expressão gênica, como o funcionamento das proteínas envolvidas no crescimento e divisão celulares, metabolismo, diferenciação e adaptação a diversas condições ambientais (Burnside & Rajagopal, 2011; Ruggiero & De Simone, 2012). Além disso, muitas proteínas procarióticas fosforiláveis têm sido associadas à virulência, devido à sua ação em diversos substratos da célula hospedeira (Whitmore & Lamont, 2012; Canova & Molle, 2014; Fujita et al., 2014).

Embora se tenha pensado que a fosforilação proteica em bactérias estivesse associada apenas aos SDCs e aos sistemas de fosfotransferase, os avanços da Biologia Molecular dos últimos anos revelaram a existência de um grande número de serina-treonina cinases (e respectivas fosfatases) em procariotas (Burnside & Rajagopal, 2011). Essas enzimas são muito semelhantes às encontradas em eucariotas e designadas com as siglas STK ou STPK (*Serine-Threonine Kinase* ou *Serine-Threonine Protein Kinase*) e STP (*Serine-Threonine Phosphatase*), além das notações eSTK e eSTP, nas quais a letra *e* significa eucariota-símile (*eukaryote-like*) (Pereira, Goss E Dworkin, 2011). A disponibilidade de muitos genomas procarióticos sequenciados levou à rápida identificação de padrões estruturais característicos dessas cinases (Krupa & Srinivasan 2005; Pérez & Castañeda-García, 2008). O número de STPK continua crescendo e estas enzimas são agora consideradas ubíquas. Também ficou claro que os procariotas exibem notável diversidade de vias de transdução de sinais (Kennelly, 2002; Galperin et al., 2010).

A descoberta de sistemas de sinalização semelhantes aos de eucariotas em microrganismos patogênicos despertou grande interesse na compreensão de seu funcionamento. Isto se deve parcialmente ao fato de que as proteínas cinases eucarióticas são no momento o maior grupo de alvos para o desenvolvimento de drogas inibidoras, perdendo apenas para os receptores acoplados às proteínas G (Bogoyevitch, Barr & Kettermann, 2005; Cheng & Force, 2010). Estudos sobre a estrutura e fisiologia das STPKs e STPs de patógenos humanos ganharam relevância devido à perspectiva de que essas enzimas possam ser usadas como alvos para ação de novas estratégias antibacterianas (Burnside & Rajagopal, 2011).

3.6.1 Estrutura das serina-treonina cinases bacterianas

A fosforilação proteica em resíduos de serina, treonina ou tirosina foi inicialmente descrita em eucariotas. Após os estudos iniciais, a relevância funcional destas modificações tornou-se evidente ao se perceber que a fosforilação é um mecanismo-chave de regulação da atividade proteica e, por extensão, do controle das funções celulares (Pereira, Goss & Dworkin, 2011).

As enzimas procarióticas STPK (cinases) e STP (fosfatases) lembram as moléculas eucarióticas já que exibem identidade de sequência em torno de 35%. Em geral, as bactérias apresentam apenas uma cópia de cada um dos genes que codificam determinada cinase e sua fosfatase cognata. Esses genes fazem parte do mesmo operon e são transcritos conjuntamente. A maioria das STPK procarióticas consiste em proteínas associadas à membrana celular, enquanto as fosfatases cognatas são encontradas no citoplasma. O centro catalítico das STPK de membrana está na porção aminoterminal da enzima, o que prediz uma localização intracelular (Burnside & Rajagopal, 2011).

As serina-treonina e tirosina cinases fazem parte de uma superfamília de proteínas, com base na homologia das sequências dos domínios proteicos (Hunter & Hanks, 1995). As cinases são interruptores moleculares que só podem existir no estado inativo ou ativo (Huse & Kuriyan, 2002). A transição para o estado ativado depende de diversos sinais, incluindo a ligação de efetores alostéricos, localização celular e interação com outras proteínas. Tanto a hélice α C aminoterminal, quanto a alça que faz parte do segmento de ativação passam por extensas alterações conformacionais, indispensáveis para esta transição.

O segmento de ativação é a região situada entre os motivos DEG e APE (Nolen, Taylor & Ghosh, 2005) e inclui o trecho que se liga a magnésio, a alça de ativação e a alça P+1 (crítica para o contato como substrato). A alça de ativação está envolvida na discriminação de substratos, sendo a parte mais variável do segmento de ativação. Muitas cinases são ativadas por fosforilação de pelo menos um resíduo de serina (ou treonina) na alça de ativação, tanto por autofosforilação como por transfosforilação dependente de outra cinase. Esta reação produz diversas modificações estruturais que conduzem à efetiva ligação do substrato e à catálise (Huse & Kuriyan, 2002; Nolen, Taylor & Ghosh, 2005). Outro componente importante da cinase é a alça P, que interage com os fosfatos beta e gama do ATP e tem um papel decisivo na transferência de fosforila e troca de ADP por novo ATP.

Considerando que o segmento extracelular das cinases bacterianas apresenta bastante variabilidade na sequência de aminoácidos e os patógenos exibem grande diversidade de nichos ecológicos, é provável que diferentes ligantes interajam com essas enzimas. A efetiva ativação das cinases de membrana celular parece depender da formação de dímeros moleculares após a ligação dos domínios extracelulares com seus substratos naturais (Greenstein, 2007; Barthe et al., 2010).

3.6.2 Papel de serina-treonina bacterianas na virulência bacteriana

Diversas serina-treonina cinases (STPK) têm papel importante na virulência bacteriana. *Streptococcus agalactiae* pode causar doenças invasivas em recém-nascidos, diabéticos, indivíduos imunodeficientes e em adultos idosos. No entanto, a bactéria vive como comensal na mucosa genital e no trato digestivo de mulheres saudáveis (Doran & Nizet, 2004). Por causa da transição da forma comensal para a forma invasiva, a regulação da expressão gênica em resposta a drásticas variações ambientais é crítica para a adaptação do microrganismo e os sistemas de sinalização são decisivos no processo adaptativo. *S. agalactiae* dispõe de 20 SDC e uma única STPK (Stk1) com a respectiva fosfatase (Stp1) (Lin, et al., 2009). Embora 17 dos 20 SDC sejam bem conservados na bactéria, o papel de apenas quatro destes sistemas tem sido descrito na regulação gênica (DltR/DltS, CovR/CovS, RfgA/RfgC e CiaR/CiaH).

As enzimas PknB e PppL (fosfatase) contribuem para a virulência e o estado de competência de *Streptococcus mutans*, a mais importante bactéria cariogênica. Sua virulência tem sido atribuída à versatilidade de adaptação a condições ambientais hostis e subsistência em biofilmes contendo diferentes espécies microbianas na superfície dos dentes (Hussain, 2006; Banu, 2010; Zhu & Kreth, 2010). Cepas deficientes na expressão de PknB têm menor capacidade de formar biofilme, aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo ou osmótico, menor taxa de crescimento em pH 5,0 e menor capacidade de sofrer transformação (Hussain, Branny & Allan, 2006; Banu et al., 2010; Zhu & Kreth, 2010). Mutantes deficientes na produção da fosfatase PppL exibiram diminuição de 20% na capacidade de colonização em modelos de cárie murina, indicando que a cinase e sua fosfatase cognata regulam positivamente tanto o crescimento como a virulência de *Streptococcus mutans*.

As funções fisiológicas das STP são bem menos compreendidas do que aquelas das STPK. A deleção de SP-STP e PhpP em *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*, respectivamente, produz mutantes inviáveis, salientando o papel destas enzimas na fisiologia bacteriana (Osaki et al., 2009). Considerando que as STPK regulam a divisão celular e a síntese do peptidoglicano em micobactérias, corinebactérias e estreptomicetos, é natural que as deleções de fosfatases conduzam a aberrações morfológicas. A deleção dos genes que codificam fosfatases em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* gera mutantes com defeitos diversos do peptidoglicano (Banu et al., 2010; Beltramini, Mukhopadhyay & Pancholi, 2009). Em *Myxococcus xanthus*, a deleção de Pph1 provoca alterações no crescimento, espalhamento e formação dos esporos (Sickmann & Meyer, 2001) e, em *Bacillus subtilis*, a deleção de PrpC gera mutantes com defeitos na produção de esporos e formação de biofilme (Madec et al., 2002).

Embora *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresente um gene codificador de uma PknG, ainda não se sabe qual é o seu papel na fisiologia deste patógeno. Além disso, o eventual achado de uma substância bloqueadora de PknG teria um papel

limitado no controle da linfadenite caseosa em nosso meio. Isto se deve ao fato de que nos animais claramente doentes (portadores de abscessos visíveis) é bem provável que um inibidor enzimático tenha pouco sucesso na cura e também à dificuldade inerente ao diagnóstico de animais infectados, mas sem lesões aparentes. Tanto a enzima fosfolipase D como a cinase PknG expressam-se constitutivamente em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e, por esta razão, o uso da segunda poderia ser vantajoso como antígeno auxiliar em vacinação.

4. Considerações Finais

Os genes *pknG*, *cpp*, *nanH*, *pld*, *sodC* e *spaC* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* são transcritos nas culturas laboratoriais rotineiras da bactéria, em macrófagos cultivados *in vitro* e os 5 últimos em abscessos superficiais de caprinos. Em *Corynebacterium glutamicum*, o gene *pknG* está envolvido no controle da atividade da proteína OdhI (influenciando o metabolismo da glutamina) e seu homólogo em *Mycobacterium tuberculosis* também executa uma função provavelmente semelhante.

Investigações preliminares geram muitas perguntas referente à cinase PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, no que se refere a fisiologia e eventual papel na virulência do microrganismo.

Por fim, as cinases bacterianas são objeto de intensa investigação visando encontrar inibidores de sua ação. Acreditamos que drogas com esta propriedade seriam mais úteis se aplicadas bem antes da consolidação de abscessos, ou seja, na fase em que a doença é inaparente. Esta necessidade introduz um complicador, que é o diagnóstico de animais aparentemente saudáveis mas infectados e, assim, escolhidos para aplicação da droga. Estes fatos ressaltam a importância da busca de novas vacinas e a escolha dos antígenos mais eficientes, a nosso ver, passa pela pesquisa dos reais fatores de virulência do *C. pseudotuberculosis*.

Referências

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*, (5a ed), Garland Ed.
- Arden, S.B., Chang, W.H., & Barksdale, L. (1972). Distribution of neuraminidase and n-acetylneuraminidase activities among corynebacteria, mycobacteria, and nocardias. *Journal of Bacteriology*, 112, 3, 1206-1212. 10.1128/jb.112.3.1206-1212.1972
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J., Boisclair, J., Simar, D., & Belanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59, 1-2, 67-81. 10.1016/s0167-5877(03)00060-6
- Banu, L. D., Conrads, G., Rehrauer, H., Hussain, H., Allan, E. & Van Der Ploeg, J. R. (2020). The *Streptococcus mutans* serine/threonine kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism. *Infection and Immunity*, 78, 5, 2209-2220. 10.1128/IAI.01167-09
- Barral, T. D., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Santos, A. J., Loureiro, D., Sokolonski, A. R., Azevedo, V., Borsuk, S., Meyer, R., & Portela, R. D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbial Biotechnology*, 1-11. 10.1111/1751-7915.13454
- Barthe, P., Mukamolova, G. V., Roumestand, C., & Cohen-Gonsaud, M. (2010). The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure*, 18, 5, 606-615. 10.1016/j.str.2010.02.013
- Bastos, B. L., Portela, R. W. D. ; Ribeiro, D ; Dorella, F.A.; Meyer, R.; & Azevedo, V. (2012) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Journal Clinical Cellular Immunology*, 4, 5. 10.4172/2155-9899.S4-005
- Beaman, B. L., Scates, S. M., Moring, S. E., Deem, R., & Misra, H. P. (1983). Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 1, 91-96. 10.1016/S0021-9258(18)33224-1
- Beaman, B. L., Black, C. M., Doughty, F., & Beaman, L. (1985). Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infection and Immunity*, 47(1), 35-41. 10.1128/iai.47.1.135-141.1985
- Beaman, L. & Beaman, B. L. (1990). Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infection and Immunity*, 58, 9, 3122-3128. 10.1128/iai.58.9.3122-3128.1990
- Beltramini, A. M., Mukhopadhyay, C. D. & Pancholi, V. Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infection and Immunity*, 77, 4, 1406-1416. 10.1128/IAI.01499-08.

- Bogoyevitch, M. A., Barr, R. K. & Kettermann, A. J. (2005). Peptide inhibitors of protein kinases: discovery, characterization and use. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1754, 1-2, 77-99. 10.1016/j.bbapap.2005.07.025.
- Brogden, K. A., Engen, R. L., Songer, J. G., & Gallagher, J. (1990). Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Microbial Pathogenesis*, 8, 2, 157-162. 10.1016/0882-4010(90)90080-a
- Bullen, J. W., Balsbaugh, J. L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Neumann, D., & Hart, G. W. (2014). Crosstalk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*, 289, 15, 10592-10606. 10.1074/jbc.M113.523068
- Burnside, K. & Lembo, (2011). A. Serine/threonine phosphatase Stp1 mediates post-transcriptional regulation of hemolysin, autolysis, and virulence of group B *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 51, 44197-210. 10.1074/jbc.M111.313486
- Calderón, V C W G., Rocha Filho, J T. R., Sá, M C A de, Bastos, B L ., Trindade, S C ., Cavalcante, N A da S. ., Farias, A P F de ., Wagner Dias Portela , R. ., Portela , R W D., Azevedo, V. ., & Meyer, R. . (2022). Avaliação de antígenos por ensaio imunoenzimático ELISA durante infecção experimental em caprinos com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 11 (12), e440111234549. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34549>
- Canova, M. J. & Molle, V. (2014). Bacterial Serine/Threonine Protein Kinases in Host-Pathogen Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 9473-9479. 10.1074/jbc.R113.529917
- Carne, H. R. & Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature*, 271, 5642, 246-248. 10.1038/271246a0
- Cheng, H. & Force, T. (2010). Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circulation research*, 106, 1, 21-34. 10.1161/CIRCRESAHA.109.206920
- De Rose, R., Tennent, J., Mewaters, P., Chaplin, P. J., Wood, P. R., Kimpton, W., Cahill, R., & Scheerlinck, J. Y. (2002). Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunization in sheep. *Veterinary Immunol and Immunopathology*, 90, 1/2, 55-63. 10.1016/s0165-2427(02)00221-0
- D'orazio, M., Folcarelli, S., Mariani, F., Colizzi, V., Rotilio, G., & Battistoni, A. (2001). Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 359, 1, 17-22. 10.1042/0264-6021:3590017
- Dahr, M. S., Gupta, V. & Virdi, J. S. (2013). Detection, distribution and characterization of novel superoxide dismutases from *Yersinia enterocolitica* Biovar 1A. *PLoS One*, 8, 5, 1-12. 10.1371/journal.pone.0063919
- Doran, K. S. & Nizet, V. (2004). Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Molecular Microbiology*, 54, 23-3. 10.1111/j.1365-2958.2004.04266.x
- Dorella, F. A; Pacheco, L. G., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37, 2, 201-218. 10.1128/AEM.00294-06
- Droppa-Almeida, D., Vivas, W. L. P., Silva, K. K. O., Rezende, A. F. S., Simionatto, S., Meyer, R., Lima-Verde, I. B., Delagostin, O., Borsuk, S., & Padilha, F. F. (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34, 1091-1096. 10.1016/j.vacina.2015.12.064
- Dun, K. L. R., Farrant, J. L., Langford, P. R., & Kroll, J. S. (2003). Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by Human Monocytes/Macrophages. *Infection and Immunity*, 71, 3, 1604-7. 10.1128/IAI.71.3.1604-1607.2003
- Fontaine, M. C., Baird, G., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., & Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 33-34, 5986-5996. 10.1016/j.vaccine.2006.05.005
- Fujita, Y., Nakayama, M., Naito, M., Yamachika, E., Inoue, T., Nakayama, K., Iida, S., & Ohara, N. (2014). Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signal transduction pathways. *Infection and Immunity*, 82, 1, 202-1. 10.1128/IAI.01140-12
- Galperin, M. Y., Higdon, R. & Kolker, E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular BioSystems*, 6, 4, 721-728. 10.1039/b908047c
- Gennari, M., Ghidini, V., Caburlotto, G., & Lleo, M. M. (2012). Virulence genes and pathogenicity islands in environmental *Vibrio* strains nonpathogenic to humans. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 3, 563-573. 10.1111/j.1574-6941.2012.01427.x
- Gibson, C. M. & Caparon, M. G. (2002). Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2, 928-932. 10.1128/AEM.68.02.928-932.2002
- Goel, M. C. & Singh, I. P. (1972). Purification and characterization of *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Journal of Comparative Pathology*, 82, 3, 345-53. 10.1016/0021-9975(72)90016-3
- Greenstein, A. E., Echols, N., Lombana, T. N., King, D. S., & Alber, T. (2007). Allosteric activation by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 15, 11427-11435. 10.1074/jbc.M610193200
- Guimarães, A. S., Carmo, F. B., Heinemann, M. B., Portela, R. W., Meyer, R., Lage, A. P., Seyffert, N., Miyoshi, A., Azevedo, V., & Gouveia, A. M. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 8, 7, 68. 10.1186/1746-6148-7-68
- Haynes, J. A., Tkalcevic, J., & Nisbet, I. T. (1992). Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Gene*, 119, 1, 119-121. 10.1016/0378-1119(92)90075-z

- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 165–170. 10.1016/s1369-5274(00)00070-9
- Hodgson, A.L., Bird, P., & Nisbet, I.T. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 172, 3, 1256-1262. 10.1128/jb.172.3.1256-1261
- Hodgson, A. L. M., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L. A., McColl, M., & Cameron, A. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 17, 802-808. 10.1016/s0264-410x(98)00264-3
- Hunter T, & Hanks S k. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal*, 9, 8, 576-596
- Huse, M. & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 09, 3, 275-282. 10.1016/s0092-8674(02)00741-9
- Hussain, H., Branny, P. & Allan, E. (2006). A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 88, 4, 1628-32. 10.1128/JB.188.4.1628-1632.2006
- Kennelly, P. J. (2002). Review Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 206, 1, 1-8. 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10978.x
- Kim, S., Oh, D. B., Kwon, O., & Kang, H. A. (2010). Construction of an in vitro trans-sialylation system: surface display of *Corynebacterium diphtheriae* sialidase on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 4, 893-903. 10.1007/s00253-010-2812-z
- Koul A., Choidas, A., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y., & Ullrich, A. (2001). Serine/threonine protein kinases PknF and PknG of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization and localization. *Microbiology*, 147, 8, 2307-2314. 10.1099/00221287-147-8-2307
- Krupa, A. & Srinivasan, N. (2005). Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics*, 6, 129,. 10.1186/1471-2164-6-129
- Kumar, J., Tripathi, B. N., Kumar, R., Sonawane, G. G., & Dixit, S. K. (2013). Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 6, 1429-1435. 10.1007/s11250-013-0381-8
- Kurniyati, K., Zhang, W., & Zhang, K., Li, C. (2013). A surface-exposed neuraminidase affects complement resistance and virulence of the oral spirochaete *Treponema denticola*. *Molecular Microbiology*, 89, 5, 842-856. 10.1111/mmi.12311
- Lin, W.J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., Rajagopal, L. (2009). Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Molecular Microbiology*, 71, 6, 1477-1495. 10.1111/j.1365-2958.2009.06616.x
- Lowrie, D.B. How macrophages kill tubercle bacilli. *Journal of Medical Microbiology*, v.16, n.1, p.1-12, Feb 1983. 10.1099/00222615-16-1-1
- Madec E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., & Séror, S. (2002). Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Molecular Microbiology*, 46, 2, 571-586. 10.1046/j.1365-2958.2002.03178.x
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 5600, 1912-1934. 10.1126/science.1075762
- May, M. & Brown, D. R. (2009). Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 137, 3-4, 380-3. 10.1016/j.vetmic.2009.01.009
- Mehra, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., Köster, S., Penberthy, K., Kubota, Y., Dricot, A., Rogan, D., Vidal, M., Hill, D. E., Bean, A. J., & Philips, J. A. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathogens*, 9, 10,. 10.1371/journal.ppat.1003734
- Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M., & Lee, M. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*, 182, 24, 6874-6883. 10.1128/JB.182.24.6874-6883.2000
- Moore, K.E. & Gozani, O. (2014). An Unexpected Journey: Lysine Methylation Across the Proteome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839-1851. 10.1016/j.bbagr.2014.02.008
- Mukherjee, P. & Mani, S. (2013). Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 11, 2226-2232. 10.1016/j.bbapap.2013.01.022
- Neurath, H. (1989). Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends in Biochemistry Science*, 14, 7, 268-71. 10.1016/0968-0004(89)90061-3
- Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B., & Bott, M. (2006). Corynebacterial Protein Kinase G Controls 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Activity via the Phosphorylation Status of the OdhI Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 18, 12300-12307. 10.1074/jbc.M512515200
- Nikolaki, S. & Tsiamis, G. (2013). Microbial diversity in the era of omic technologies. *BioMed Research International*, 2013:958719. 10.1155/2013/958719
- Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh G. (2005). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell*, 15, 5, 661-675. 10.1016/j.molcel.2004.08.024
- Osaki M., Arcondéguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., & Trombe, M .C. (2009). The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: cellular organization and physiological characterization. *Journal of Bacteriology*, 191, 15, 4943-50. 10.1128/JB.00196-09
- Paton, J. C., Andrew, P. W., Boulnois, G. J., & Mitchell, T. J. (1993). Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annual Review of Microbiology*, 47, 89-115. 10.1146/annurev.mi.47.100193.000513

- Pereira, S. F., Goss, L. & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 75, 1, 192-212. 10.1128/MMBR.00042-10
- Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R., & Muñoz-Dorado, J. (2008). Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 41, 15950-19955. 10.1073/pnas.0806851105
- Postma, P. W. & Lengeler, J. W. (1985). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiology Reviews*, 49, 3, 232-69. 10.1128/mr.49.3.232-269.1985
- Prachi, P., Donati, C; Masciopinto, F., Rappuoli, R., & Bagnoli, F. (2013). Deep sequencing in pre- and clinical vaccine research. *Public Health Genomics*, 16, 1-2, 62-68. 10.1159/000345611
- Raynal, J.T., Bastos, B.L., Vilas-Boas, P.C.B., Sousa, T.J., Costa-Silva, M., De Sá, M.C.A., Portela, R.W., Moura-Costa, L.F., Azevedo, V., & Meyer, R. (2018). Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Research Notes*, 11, 73. 10.31533/pubvet.v13n8a391.1-7
- Rowland, J. L. & Niederweis, M. (2012). Resistance mechanisms of Mycobacterium tuberculosis against phagosomal copper overload. *Tuberculosis (Edinb)*, 92, 3, 202-210. 10.1016/j.tube.2011.12.006
- Ruggiero, A., De Simone, P., Smaldone, G., Squeglia, F., & Berisio, R. (2012). Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective. *Current Protein & Peptide Science*, 13, 8, 756-766. 10.2174/138920312804871201
- Sá, M. C. A; Silva, W. M. Da; Rodrigues, C. C., Rezende, C. P., Marchioro, S. B., Filho, J. T. R., Sousa, T. J., Oliveira, H. P., Figueiredo, H. C. P., Portela, R. P., Castro, T. L; Azevedo, V., Seyffert, N., & Meyer, R. (2021). Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated From Goats. *Frontiers In Veterinary Science*, 8, 1-10. 10.3389/fvets.2021.614011
- Safavi, F. & Rostami, A. (2012). Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Pathology*, 93, 3, 428-433. 10.1016/j.yexmp.2012.09.014
- Sansone, A., Watson, P. R., Wallis, T. S., Langford, P. R., & Kroll, J. S. (2002). The role of two periplasmic copper- and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of *Salmonella choleraesuis*. *Microbiology*, 148, 3, 719-726. 10.1099/00221287-148-3-719
- Sickmann, A. & Meyer, H.E. (2001). Phosphoamino acid analysis. *Proteomics*, 1, 2, 200-206. 10.1002/1615-9861(200102)1:2<200::AID-PROT200>3.0.CO;2-V
- Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, 5, 4, 156. 10.1016/S0966-842X(97)01005-6
- Songer, J. G. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 2, 223-6.
- Stafford, G., Roy, S., Honma, K., & Sharma, A. (2012). Sialic acid, periodontal pathogens and *Tannerella forsythia*: stick around and enjoy the feast! *Molecular Oral Microbiology*, 27, 1, 11-22. 10.1111/j.2041-1014.2011.00630.x
- Suo, Y., Huang, Y., Liu, Y., Shi, C., & Shi, X. (2012). The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. *PloS One*, 7, 10. 10.1371/journal.pone.0048467
- Tachedjian, M., Krywult, J., Moore, R. J., & Hodgson, A. L. (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, 13, 18, 1785-1792. 10.1016/0264-410x(95)00144-p
- Tonello, F. & Zornetta, I. (2012). *Bacillus anthracis* factors for phagosomal escape. *Toxins (Basel)*, 4, 7, 536-553. 10.3390/toxins4070536
- Tong, H. H., Li, D., Chen, S., Long, J. P., & Demaria, T. F. (2005). Immunization with recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase NanA protects chinchillas against nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*, 73, 11, 7775-8777. 10.1128/IAI.73.11.7775-7778.2005
- Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J., Dorella, F.A., Rocha, F.S., Soares, S.C., D'afonseca, V., Miyoshi, A., Ruiz, J., Silva, A., Azevedo, V., Burkovski, A., Guiso, N., Join-Lambert, O.F., Kayal, S., & Tauch, A. (2010). The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 11, 728. 10.1186/1471-2164-11-728
- Unanian, M. M., Feliciano-Silva, A. E. D., & Pant, K. P. (1985). Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid northeast Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 17, 1, 57-62. 10.1007/BF02356137
- Usuda Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., & Matsui, H. (1996). Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('Brevibacterium lactofermentum' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology*, 142, 12, 3347-3354. 10.1099/13500872-142-12-3347
- Walker, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N., Wilson, M. J., & Brandon, M. R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and Immunity*, 62, 6, 2562-2567. 10.1128/iai.62.6.2562-2567.1994
- Whitmore, S. E. & Lamont, R. J. (2012). Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *International Journal of Oral Science*, 4, 1, 1-6. 10.1038/ijos.2012.6
- Wilson, M. J., Brandon, M. R. & Walker, J. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 63, 1, 206-211. 10.1128/iai.63.1.206-211.1995
- Windsor, P. A. (s.d). Control of caseous lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27, 1, 193-202. 10.1016/j.cvfa.2010.10.019

Wu, C. H., Tsai-Wu, J. J., Huang, Y. T., Lin, C. Y., Liou, G. G., & Lee, F.J. (1998). Identification and subcellular localization of a novel Cu/Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*, 439, 1-2, 192-196. 10.1016/s0014-5793(98)01373-8

Yeats, C., Finn, R. D. & Bateman, A. (2002). The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 9, 438-440. 10.1016/s0968-0004(02)02164-3

Yozwiak, M. L., Songer, J.G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic response of ovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 3, 392-7

Zhu, L. & Kreth, J. (2010). Role of *Streptococcus mutans* eukaryotic-type serine/threonine protein kinase in interspecies interactions with *Streptococcus sanguinis*. *Archives of Oral Biology*, 55, 5, 385-90. 10.1016/j.archoralbio.2010.03.012