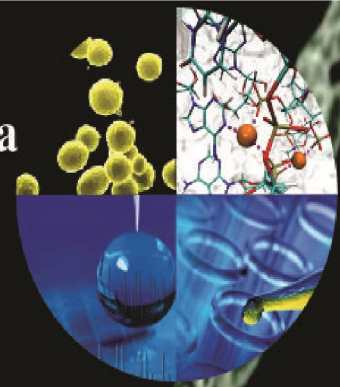


UFG

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública



**Perfil do exoproteoma e identificação de
proteínas imunogênicas secretadas por
*Staphylococcus saprophyticus***

Candidato: Lucas Silva de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Parente Rocha

Goiânia - GO
Abril/2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Lucas Silva de Oliveira			
E-mail:		lucas-biologo@hotmail.com			
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo empregatício do autor		Estudante de Pós-Graduação nível: Mestrado			
Agência de fomento:		Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico		Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:		Perfil do exoproteoma e identificação de proteínas imunogênicas secretadas por <i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
Palavras-chave:					
Título em outra língua:					
Palavras-chave em outra língua:					
Área de concentração:		Microbiologia, Bioquímica e Biologia Molecular			
Data defesa: (dd/mm/aaaa)		23/04/2014			
Programa de Pós-Graduação:		Medicina Tropical e Saúde Pública			
Orientador (a):		Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão			
E-mail:		alexandre.bailao@gmail.com			
Co-orientador (a):*		Profª. Drª. Juliana Alves Parente-Rocha			
E-mail:		juparente@gmail.com			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Lucas Silva de Oliveira

Data: **14/10/2015**

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Lucas Silva de Oliveira

“Perfil do exoproteoma e identificação de proteínas imunogênicas secretadas por *Staphylococcus saprophyticus*”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública, Área de concentração: **Microbiologia**.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Parente Rocha

Goiânia - GO
2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Oliveira, Lucas Silva de

“Perfil do exoproteoma e identificação de proteínas imunogênicas secretadas por *Staphylococcus saprophyticus*” [manuscrito] / Lucas Silva de Oliveira. - 2014.

XVIII, 63 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão; co-orientadora Dr^a.
Juliana Alves Parente-Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Staphylococcus saprophyticus*. 2. exoproteoma. 3. imunoproteômica. 4. transglicosilase IsaA. 5. virulência. I. Bailão, Alexandre Melo, orient. II. Parente-Rocha, Dr^a. Juliana Alves, co orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Lucas Silva de Oliveira

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Co-orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Juliana Alves Parente Rocha

MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG)

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Giambiagi de Marval (IM/UFRJ)

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFG)

MEMBRO INFORMAL:

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Alves Parente Rocha (ICB/UFG)

MEMBROS SUPLENTE:

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Lamaro Cardoso (IPTSP/UFG)

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Casaletti (ICB/UFG)

Prof^ª. Dr^ª. Lílian Cristiane Baeza (ICB/UFG)

DATA: 23/04/2014

HORÁRIO: 09h00min

“Dedico esta conquista a todos os meus mestres, que neste caminho árduo do aprendizado, me ensinaram que o importante é aprender com alegria, ensinar com amor, e respeitar o próximo!”

A importância de decidir

*Procuro semear o otimismo
E plantar sementes de paz e justiça.
Digo o que penso, com esperança.
Penso no que faço, com fé.
Faço o que devo fazer, com amor.
Eu me esforço para ser cada dia melhor,
Pois bondade também se aprende.
Mesmo quando tudo parece desabar,
Cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
Ir ou ficar, desistir ou lutar,
Porque descobri, no caminho incerto da vida,
Que o mais importante é o decidir.*

Cora Coralina (Poetisa e contista goiana)

AGRADECIMENTOS

Confesso que fiquei por muito tempo a pensar de como poderia expressar a todos aqueles que participaram de forma ativa e/ou indiretamente em muitos momentos especiais da minha vida. Acredito que essa é uma ocasião em que me parece ser oportuno para tal.

Inicialmente gostaria de agradecer à Deus, por mais uma vitória concedida a mim, e por sempre me amparar em momentos em que me sentia pequeno e desolado.

Aos meus amados pais, que me concederam o dom da vida: Cleide e Jorge. Vocês sempre se empenharam tanto para dar a mim e a minha irmã (Vanessa) tudo do bom e do melhor, para que nada faltasse, e essa vitória é também de vocês!!! Obrigado por todos os momentos que eu me senti ‘desesperado’ e muitas vezes angustiado por diversas dificuldades impostas pela vida, mas vocês sempre estiveram lá nos apoiando. Só tem uma coisa que posso dizer: “Eu amo vocês!!!”

À minha querida irmã (Vanessa Oliveira), por ser a minha irmã no sentido literal da palavra em diversas situações!!! E por nos dar a coisa mais linda do mundo... A Clarinha!!! Amo vocês do fundo do meu coração!

Aos meus padrinhos: Creusa e Osvaldo, por serem praticamente os meus segundo “mãe e pai”, e por estarem sempre participando de forma de forma ativa para o meu crescimento pessoal e profissional... O meu muito obrigado!!! Amo vocês!!!

Aos meus queridos avós maternos: Maria e Joaquim... Muito obrigado por sempre estarem presentes e me incentivando... Amo vocês!!!

À minha avó paterna (in memoriam) Maria... Espero que você esteja aí no céu me vendo neste momento, e se emocionado por mais uma conquista do seu neto... Saudades vó... Amo você!!!

O meu crescimento profissional e intelectual, não seria possível sem a presença de certas pessoas que durante o meu período de graduação e pós-graduação não tivessem me instigado a sempre querer ser um pouquinho melhor do que sou hoje.

Uma das pessoas que eu mais admiro como colega de profissão, e que eu tive a honra de ter como professora se chama Josana de Castro Peixoto. A Prof^a. Josana sempre foi uma pessoa muito especial, e referencial de como ser um profissional no que se restringe aos atributos do biólogo. Ela foi uma das professoras que sempre me encorajou a encarar uma pós-graduação, pois acredito, que via em mim algum potencial para tal, mas além de encorajar, também sempre estava presente em momentos difíceis dando conselhos que sempre foram ouvidos com muita atenção. Sua postura, carinho e proximidade com os alunos, além de seu nível intelectual formam com certeza absoluta e inquestionável, os ingredientes secretos para uma professora que sempre me encantou pela sua conduta pessoal e profissionalismo. Você é não só para mim, mas para diversos alunos, uma professora memorável, por isso, lhe agradeço imensamente Prof^a. Josana, por ter feito parte da minha formação profissional, e por ser uma amiga nas horas difíceis.

À Prof^a. Juliana Rodrigues, a qual tive a honra de tê-la como professora de morfologia vegetal e ecologia, e sempre me estimulou a encarar uma pós-graduação, pois acreditava no meu potencial. Obrigado imensamente pela participação ativa, e por ser um referencial de profissional para mim, demonstrando sua postura ética, respeito e inteligência.

De maneira alguma, eu posso esquecer da Prof^a. Juliana Lamaro Cardoso, que foi para

mim, uma professora decisiva no rumo que eu teria na minha carreira profissional, e que quando cheguei a UFG, uma vez que eu não me formei aqui, tive o prazer de reencontrá-la. A Prof^ª Juliana Lamaro foi a minha professora de Microbiologia e Imunologia na graduação, e até hoje me lembro da sua primeira aula de estrutura da parede celular de bactérias, e ela com o seu 'porte incisivo' de professora (que ao meu ver, nasceu junto com ela), e com a sua maneira articulada e única de explicar as coisas... Foi realmente um vislumbre para mim, pois vi naquela professora uma pessoa que eu poderia aprender e sentir mais vontade de aprender cada vez mais. Acredito que foi uma das disciplinas que eu mais estudei para ser aprovado, e com certeza, com as provas mais difíceis que eu fiz (não ria Prof^ª, pois é verdade!...rsrsrs), mas com certeza absoluta valeu a pena cada minuto e gota de esforço!!! Por isso minha querida Prof^ª. Juliana Lamaro Cardoso, aqui eu expresso a minha imensa gratidão à você, e por todos os momentos de conversas que tivemos, e a sua presteza para comigo em diversos momentos que eu me rendi a você para me auxiliar. Você é uma profissional que eu me espelho!!! Um grande abraço e sucesso sempre!!!

Acredito que quando Deus estava me fazendo ele pensou: "Ah, Eu acho que vou encher a vida desse menino com "Julianas"... rsrsrs. Reservo uma boa parte dos meus agradecimentos para a minha estimada e queridíssima "co-orientadora/orientadora", a Prof^ª. Dr^ª. Juliana Alves Parente Rocha. Acredito que foi no final de 2011, eu estava sentado na cadeira do meu escritório, onde eu trabalha (em um distribuidor de alimentos), eu estava prestes a concluir a minha graduação em ciências biológicas, e devido as influências das Prof^{ªs}. Josana, Juliana Rodrigues e Juliana Lamaro, eu estava realmente certo que queria fazer o mestrado, mas a questão era: Qual orientador e área de pesquisa? (visto que eu não me formei na UFG). Daí, eu comecei uma saga no envio de e-mails para procurar um orientador da área de bioquímica e biologia molecular, pois sempre gostei dessas disciplinas na graduação, e sempre tive muita facilidade para aprendê-las. Uma das pessoas quem eu havia enviado o e-mail foi para a Prof^ª. Juliana Parente, o que, para a minha surpresa foi respondido quase de imediato, visto que ninguém mais tinha me respondido...rsrs. Começamos a trocar alguns e-mails, e certo dia ela me convidou para ir até ao LBM para conhecer a infraestrutura, e começar um estágio. Quando cheguei lá, me encantei pelo fato de encontrar na minha frente uma pessoa humilde e extremamente profissional, que sempre me tratou com maior estima e educação, e isso, a gente nunca esquece! Comecei o estágio no LBM, e de fato, me deparei com um mundo totalmente novo para mim, pois eu não tinha absolutamente nenhuma prática laboratorial, mas ela sempre foi muito paciente comigo, me mostrando as vidrarias, explicando e escrevendo os protocolos para mim, até mesmo os mais básicos. Acho que um dos grandes atributos de qualquer profissional é a postura que ele exerce, não deixando o seu posto persuadido, e isso, você sempre demonstrou para mim e a todos os seus alunos. Acredito que não existem palavras que possam quantificar a minha gratidão, respeito e admiração à você, devido a sua paciência, compreensão e humanidade que sempre teve. Obrigado por sempre tirar as minhas dúvidas (tanto experimentais e teóricas), pela confiança sempre depositada em mim, desde o início, pelo aprendizado que eu obtive pelo seu intermédio... O meu muito obrigado! Você sempre terá meu respeito e admiração! Você é o orientador que qualquer aluno sonha em ter!!!

Gostaria de agradecer a Prof^ª. Célia Maria de Almeida Soares, pela pesquisadora de excelência que ela é, e pela fibra em coordenar o Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade Federal de Goiás. Acredito que todos nós do LBM sabemos da dificuldade que é ser um pesquisador no Brasil, frente a todas as dificuldades

(especialmente financeiras), para produzir trabalhos de qualidade, e ainda manter uma infra-estrutura como o LBM. Muito obrigado pela oportunidade e confiança!

Ao meu 'orientador posição' (rsrsrs) Prof. Alexandre Melo Bailão, por ter me cedido a vaga para a seleção no IPTSP, uma vez que a Prof^a. Juliana Parente não é cadastrada lá. Agradeço imensamente pela oportunidade e confiança dada, e por todas as conversas produtivas e conselhos dados para o bom andamento do trabalho, além do meu próprio conhecimento. Você tem o meu respeito e admiração!

Às Prof^{as}. Maristela Pereira e Silvia Maria Salém Izaac, por sempre serem abertas a discussões, não necessariamente envolvendo o meu trabalho, mas que foram importantes para o meu crescimento intelectual. Muito obrigado e os meus sinceros votos de sucesso!

Ao Prof. Clayton Luiz Borges pelo carisma e extrovertibilidade que sempre teve. Pelas contribuições feitas no exame de qualificação do meu trabalho, juntamente com a Prof^a. Silvia, que foram extremamente pertinentes na avaliação do trabalho, e que com certeza foram úteis para a finalização do mesmo. Um grande abraço!

O que seria de mim sem os meus queridos colegas de sofrimento... Ops... de Pós-graduação (rsrsrsrs)? Gostaria de expressar os meus agradecimentos aos meus estimados colegas, que sempre se mostraram presentes e ativos contribuindo na minha formação.

Acredito que não é segredo para ninguém, que eu guardo com muito carinho, afeto e admiração um lugar especial no coração para duas pessoas que eu tive a honra e privilégio de conhecer no LBM. E estas duas pessoas tem por nome Sheyla Maria Rondon Caixeta Bonfim e Tereza Cristina Vieira de Rezende (Cris). Foram dias de alegrias, tristezas, alegrias, alegrias e mais algumas tristezas (rsrsrs). Mas o que seria da vida se nós não tivéssemos alguns dias bons e outros ruins para compartilhar com os amigos? A Sheyla e a Cris são para mim um referencial do verdadeiro significado de amizade, compreensão, parceria e idoneidade. Além de serem extremamente comprometidas, sérias e éticas no que fazem, são o sinônimo da amizade, pois em diversos momentos, elas mostraram o verdadeiro significado da expressão: "Amigo é para hora boa ou ruim..." Não há tesouro no mundo que possa recompensar o significado da amizade de vocês para mim. Vocês estarão comigo sempre, em qualquer lugar que eu estiver!!! Um grande beijo e abraço para vocês minhas queridas amigas!!!

Vários momentos de descontração e alegria eu compartilhei com as minhas queridas amigas Renata Prado (Ai meu Deus, Ai meu Deus!!! Hehehehe), Symone (Symoneide), Karine (eterna PF), Pryscilla ('Grávida', ou pelo menos 'Ex-grávida), Dayane, Daciene (Daci) e Patrícia Zambuzzi. Vocês tornaram os dias mais agradáveis, não só pela presença e carisma de vocês, mas pelo caráter e profissionalismo que vocês sempre tiveram e demonstraram. Desejo sucesso na vida de vocês!!! Um grande beijo e abraço!!!

Às minhas queridas parceiras de seleção, Lívia e Juliana de Curcio, obrigado pela ajuda que vocês me deram durante o período da seleção, e pelo comprometimento e garra que vocês sempre demonstraram. Os meus mais sinceros votos de sucesso no doutorado e na vida de vocês! Um grande beijo!

Aos grandes Leandro Nascimento ('Box') e Neto, que sempre foram os parceiros para o "café" de todos os dias...rsrsrs. Muito obrigado pela amizade e companhia!!! Um grande abraço!

Às queridas Mirelle, Elisa e Patrícia Lima, pelo conhecimento compartilhado sempre que eu as "importunava"...rsrsrs. E me desculpem por todas as vezes que vocês abriram o almoxarifado e geladeira/freezer para mim fora do horário... rsrsrs (Não era a intenção!!! Rsrssrs).

À Ana Flávia Alves Parente (Fafá), muitíssimo obrigado pela ajuda em diversos momentos na execução deste trabalho (principalmente na parte da proteômica). Agradeço o conhecimento compartilhado e presteza para me explicar sobre espectrometria de massas. Como sempre você demonstra o comprometimento para a ciência e a ajudar o próximo. Desejo tudo de bom para você aí na UFAM, e receba as minhas boas vibrações! Um grande abraço.

Às minhas queridíssimas e estimadas Dr^{as}. Casaletti e Baeza. Muitíssimo obrigado a Luciana (Lu) e Lillian (Lili) pelo companheirismo, comprometimento, presteza e acima de tudo, a postura ética que sempre tiveram. Vocês são exemplos de profissionais ao qual eu me espelho. Agradeço também pelas experiências compartilhadas, não somente daquilo que se restringe ao trabalho, mas pelas diversas conversas que tivemos dos mais diversos cunhos, além das ajudas que sempre foram dadas quando me voltei a vocês. Um grande beijo para vocês! E muitíssimo obrigado!!!

Aos 'boys' do LBM: Luiz Paulo, André, Lucas Nojosa, Zairo, Igor, Kléber, Alessandro, Gabriel, Felipe, Paulo Henrique e Leandro Prado. Obrigado pelos momentos de descontração, alegria e aprendizado. Sucesso na vida de vocês!!!

Às 'girls' do LBM: Danielle, Edilânia, Laurine, Mirlane, Mirlene, Maisa, Miriam, Diandra, Mariana, Amanda ('Senhora'), Paula, Laura (Laurita), Karla ('babe'), Carla Pelosi (Dr^a. Scarabel Pelosi), Marielle, Fabiana ('Vanessa'), Vanessa ('Fabiana') e Joyce. Agradeço por todos os momentos em que vocês participaram da minha rotina, e sobretudo, tornando os dias no LBM, dias de aprendizado e alegria. Um grande abraço e beijo para vocês! Sucesso!

Um agradecimento especial aos meus colegas de projeto com Staphylococcus saprophyticus: Alex Carvalho, Anna Clara, Hanna Hamano (Neném), Isabella, Bianca e Guilherme. Boa sorte na caminhada de vocês, e muito sucesso! No que precisarem, eu estarei aqui para ajudar da melhor forma possível. Um grande abraço para vocês!

À aquelas que por pouco tempo fizeram parte da minha rotina acadêmica, mas que os breves momentos se tornaram especiais, devido as pessoas que são. Obrigado a Kelly Pacheco, Luciane Madureira e Luciene Coelho.

Às minhas queridas amigas durante o período da minha graduação: Irani, Denise, Clícia e Amanda Borges. Agradeço a vocês pelo incentivo e por todos os momentos que passamos juntos. Vocês tornaram a minha graduação muito especial, principalmente pelo companheirismo que vocês sempre demonstraram, e muito obrigado por aturar este chato aqui por 4 anos!!! Um grande abraço!!! Saudades de todas vocês...

Aos estimados secretários do IPTSP: Zezinho e Kariny. Agradeço a prestatividade e compromisso, sempre que me recorri a vocês! Um grande abraço.

Às agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPESP, que subsidiaram a execução deste projeto.

Enfim... Agradeço mais uma vez a todos (e aqueles que porventura eu me esqueci), deixo aqui o meu muito obrigado!

Lucas Oliveira

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO	xii
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	xiii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1. O gênero <i>Staphylococcus</i> e a espécie <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21
1.1.1. Fatores de virulência em <i>S. saprophyticus</i>	24
1.1.2. Vias de secreção de proteínas em bactérias	27
1.1.2.1. Sec-translocase e Via Tat (T2SS)	29
1.1.2.2. Outras vias de secreção em <i>Firmicutes</i>	33
1.1.2.3. Vias não-clássicas	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo Geral;	38
3.2. Objetivos Específicos;.....	38
4 MÉTODOS	39
4.1. Manutenção e cultivo de <i>S. saprophyticus</i>	39
4.2.1. Preparação, precipitação e quantificação de proteínas secretadas por <i>S. Saprophyticus</i>	39
4.2.2. Obtenção dos anticorpos policlonais	40
4.2.3. 2-DE-SDS-PAGE e Western-blotting	40
4.2.4. Preparação de amostra e Digestão <i>in gel</i>	42
4.2.5. Preparação e digestão das amostras proteicas para nano-ESI-UPLC-MS ^E ..	43
4.2.6. Instrumentação do nano-ESI-UPLC-MS ^E	44
4.2.7. Processamento dos dados e identificação de proteínas.....	45
4.2.8. Análise <i>in silico</i> das proteínas identificadas no exoproteoma de <i>S. saprophyticus</i>	46
4.3. Comitê de ética	46
5 RESULTADOS	47
5.1. Otimização da extração das proteínas secretadas por <i>S. saprophyticus</i>	47
5.2. Identificação das proteínas secretadas por <i>S. saprophyticus</i>	47
5.3. Análise <i>in silico</i> do exoproteoma de <i>S. saprophyticus</i>	52
5.4. Imunização dos camundongos e identificação de proteínas imunogênicas	55
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO (Manuscrito submetido na <i>Microbes and Infection</i>).....	81

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Óperon relacionado à síntese da cápsula polissacarídica em *S. saprophyticus*. *gtaB*, é um gene *upstream* do óperon que codifica para UTP-glicose-1-fosfato-uridiltransferase; o cluster do cassete estafilocócico SCC_{15305cap}, é composto de genes que codificam UDP-D-FucNAc (*capD* e *capL*), UDP-FucNAc transferase (*capK*), UDP-glicose-6-desidrogenase (*capI*) e várias glicosiltransferases (*capE*, *capF*, *capG*, *capH* e *capJ*). A orientação de *capJ*, é oposta aos demais genes do óperon, e aparentemente *capL* é um gene truncado. O cluster *capABCD*, é conservado entre as espécies *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus*. A porcentagem do conteúdo G+C de cada gene está abaixo da seta. [Figura obtida do artigo: Park et al. Characterization of the structure and biological functions of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Bacteriology*, 192(18), pp. 4618-4626, 2010].

Figura 2. Esquema das vias de secreção conhecidas em bactérias. Type I Secretion System (T1SS), secreta predominantemente toxinas, proteases e lipases para o meio extracelular, e sua maquinaria é composta por ATP-binding protein [ABC], MFP e OMP, enquanto que Type II Secretion System (T2SS), é o sistema Sec-dependente melhor conhecido, que por sua vez também promove a secreção de proteínas necessárias para virulência de patógenos humanos, é constituído por uma ATPase (SecA) e um arranjo trimérico SecYEG. Type III Secretion System (T3SS), no entanto a estrutura de “injectiossoma” permite a secreção de proteínas diretamente na célula do hospedeiro, que modulam respostas imune do hospedeiro. Type IV Secretion System medeia o transporte de DNA e proteínas relacionadas com ácidos nucleicos através da membrana celular para as células eucarióticas, do qual necessita o contato célula-célula. Type V Secretion System (T5SS), possui a característica de autotransporte Sec-dependente, tendo uma proteína auxiliar (Omp85) para secreção de proteínas que contribuem para a virulência e patogenicidade. Type VI Secretion System (T6SS) possui analogia com T3SS e T4SS, e possui uma complexa maquinaria, que é frequentemente relatada por estar envolvida na interação com células eucarióticas, enquanto que o sistema de secreção Type VII Secretion System (T7SS), foi relatado inicialmente em micobactérias, porém tem sido observada sua importância em estafilococos. Pouco se sabe sobre este sistema de secreção, no entanto, já foi relatada sua contribuição na virulência de *S. aureus*, apesar de não apresentar peptídeo sinal. **Legenda:** OM, membrana externa; IM, membrana interna; HM, membrana do hospedeiro; MM, micomembrana; OMP, proteína de membrana externa; MFP, proteínas de fusão da membrana. ATPases e chaperonas são demonstradas em amarelo. [Figura obtida do artigo: Tseng et al. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9 (Suppl. 1), S2, 2009].

Figura 3. Representação esquemática do sistema de secreção Sec-dependente. O translocon Sec-dependente de bactérias (azul) abrange a membrana plasmática a consiste de SecYEG. SecA (vermelho) atua na periferia citoplasmática. Outras proteínas auxiliares interagem com a translocase YidC (amarelo) e o complexo SecDF (YajC) (cinza claro). Os peptídeos sinais das pré-proteínas são clivados na face periplasmática da membrana por peptidases sinais (SPases). (A) As proteínas sintetizadas no ribossomo (amarelo claro) destinados para secreção são posteriormente marcados após

translocação pela Sec-translocase, que necessita de SecA (ATPase). Por outro lado, a chaperona SecB (azul claro) se liga a pré-proteína, que a mantém em um estado competente de translocação e a marca para o translocon Sec para translocação. (B) Direcionamento co-traducional do ribossomo com cadeias nascentes para o complexo translocase é atingido pela ligação da sequência sinal de algumas pré-proteínas ou uma sequência sinal de ancoragem das proteínas de membrana por SRP (rosa), e o receptor SRP, FtsY (lilás). Proteínas de membrana com domínios periplasmáticos grandes necessitam da presença de SecA para o processo de translocação. YidC interage com a membrana plasmática, à medida que surgem a partir do portão lateral SecYEG. (C) Um conjunto de proteínas de membrana podem se inserir na membrana plasmática via YidC após o direcionamento das cadeia nascente do ribossomo para YidC. [Figura obtida do artigo: Plessis et al. The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), pp.851-865, 2011].

Figura 4. Representação esquemática de ESS cluster. As proteínas com funções definidas são indicadas a seguir: proteínas que são secretadas (vermelho), FtsK SpoIIIE-like ATPase (amarelo), suposta maquinaria de secreção ESS (cinza), proteínas com função desconhecida na cepa USA300 de *S. aureus* (branco) [Figura obtida do artigo: Anderson et al. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 90(4), pp. 734-743, 2013].

Figura 5. Modelo da biogênese de vesículas em bactérias Gram-negativas. Vesículas são proteolipossomos, que consistem de fosfolipídeos e lipopolissacarídeo (LPS), um conjunto de proteínas da membrana externa, e proteínas oriundas do periplasma (lúmen). Proteínas que aderem a superfície externa da bactéria (vermelho) são associadas com a superfície externa das vesículas. Proteínas e lipídeos da membrana interna e o conteúdo citosólico são excluídos da membrana externa da vesícula. As vesículas “brotam” em vários sítios na extensão celular bacteriana onde ocorre a ligação entre o peptidoglicano e a membrana externa são incomuns ou ausentes. Legenda: LPS, lipopolissacarídeo; Pp, periplasma; OM, membrana externa; PG, peptidoglicano; IM, membrana interna; Cyt, citosol. [Figura obtida do artigo: Kuehn and Kesty. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19(22), pp.2645-2655, 2005].

Figura 6. Disposição geral das funções exercidas pelas proteínas secretadas por *S. saprophyticus*. Abundância em %, das proteínas de acordo com sua função biológica anotada através do UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant (<http://pedant.gsf.de/>), das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*.

Figura 7. Sub-localidade celular. Predição de sub-localidade celular das proteínas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus*, de acordo com a ferramenta de bioinformática LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>).

Figura 8. Predição de secreção Sec-dependente e independente. Número de proteínas preditas para serem secretadas por via clássica (SignalP) e por via não-clássica (SecretomeP). Um total de 21 proteínas não foram preditas para secreção por nenhum dos algoritmos utilizados.

Figura 9. Imunização dos camundongos. Western-blotting realizado com os soros obtidos dos camundongos imunizados com o exoproteoma total de *S. saprophyticus*. À esquerda, é demonstrado o marcador de proteínas com peso molecular conhecido em

kDa. Legenda: C, controle negativo; R1, replicata 1; R2, replicata 2; R3, replicata 3.

Figura 10. Perfil do 2-DE-PAGE e Western-blotting para análise imunoproteômica. (A) Gel bidimensional (2-DE-PAGE) contendo 500µg de proteínas secretadas e corados por prata, focalizados em IPGstrips Immobiline faixa de pH 4-7, utilizados para excisar os “spots” correspondentes no (B) Western-blotting de proteínas que reagiram com o soro de camundongo imunizado. As setas apontam as proteínas imunogênicas de *S. saprophyticus*, que foram identificadas por espectrometria de massas. Legenda: IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A* ou Transglicosilase IsaA); Ssa (*Staphylococcal secretion antigen*); Eno (Enolase). À esquerda, é demonstrado o marcador de proteínas com peso molecular conhecido em kDa.

Figura 11. Qualidade da digestão trípica da transglicosilase IsaA submetida a nano-ESI-UPLC-MS^E. (A) Cromatograma e (B) Espectro obtido dos peptídeos de IsaA. O cromatograma (A) evidencia uma boa ionização na fonte (ESI), possuindo peptídeos carregados com +1, +2, +3 e +4 cargas, enquanto que o espectro (B) ilustra um pico abundante de um peptídeo com massa de 785,4666 (m/z).

Tabela 1. Lista de proteínas secretadas por *S. saprophyticus* identificadas por nano-ESI-UPLC-MS^E, classificadas quanto a sua função biológica.

Tabela 2. Lista de proteínas imunogênicas detectadas no exoproteoma de *S. saprophyticus* por *Wester-blotting* e identificadas por nano-ESI-UPLC-MS^E.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µg/µL – micrograma por microlitro

µm – micrometros

2-DE-SDS-PAGE – *2 Dimensional Electrophoresis Sulfate Dodecyl Sodium Polyacrylamide Electrophoresis*

AhpC – Alquil hidropéroxido redutase subunidade C

Arg – Arginina

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina Trifosfato

BCIP – *5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate*

BHI – *Brain Heart Infusion*

BLAST – *Base Local Alignment Search Tool*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CFP – *Culture Filtrate Protein, 10kDa*

CFU – *Colony Forming Unit*

CHAPS - [3-[(3-Colamidopropil-dimetilamonio)-propano-sulfonato]]

CoEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EF-Tu – fator de alongamento Tu

ENO – Enolase

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESAT-6 – Early secreted antigen target, 6kDa

FWHM - *Full-Width Half-Maximum*

GDP – guanina difosfato

GFP – *Green Fluorescence Protein*

GPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPI – Glicose-6-fosfato isomerase

GTP – guanina trifosfato

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IsaA – *Immunodominant Staphylococcal Antigen A*

kb – kilo base

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – Kilodaltons

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

LPSN – *List of Prokariotic Names with Standing in Nomenclature*

LPXTG – Motivo constituído de Leucina, Prolina, Treonina e Glicina

m/z – relação massa/carga

MSCRAMMS – *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de Sódio

nano-ESI-UPLC-MS^E – *nano electrospray source ionization coupled to ultra-performance liquid chromatography*

NBT – *nitroblue tetrazolium*

NH₄HCO₃ – Bicarbonato de Amônio

N-terminal – Amino-terminal

O₂⁻ - Superóxido

OONO⁻ - peroxinitrito

ORFs – Open Reading Frames (Matriz de leitura aberta)

PBS – Phosphate Saline Buffer

PLGS – ProteinLynx Global Server

PNAG – Poli-N-Acetilglicosamina

ppm – partes por milhão

pSSAP1 e pSSAP2 – Plasmídeos da cepa MS1146

pSSP1 e pSSP2 – Plasmídeos da cepa ATCC 15305

RP – coluna de fase reversa

SasF – *Staphylococcus aureus* surface protein F

SCCmecA – *Staphylococcal Cassete Chromosome mecA*

SCN – Estafilococos coagulase-negativa

scRNA – *Small Cytoplasmic RNA*

SdrI – Serina-Aspartate Repeat Protein I

SDS – Sódio Dodecil Sulfato

SOD – Superoxido dismutase

SPase – peptidase sinal

SPPase – peptidase do peptídeo sinal

SRP – *Signal Recognition Particle*

Ssp – *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein

SssF – *Staphylococcus saprophyticus* surface protein F

Tat – *Twin- Arginine Translocation*

TCA – Ácido Tricluoroacético

TFA – Ácido Trifluoroacético

TGU – Trato Genito-Urinário

TPI – Triose fosfato isomerase

UafA – Uroadherence factor A (Fator de uro-aderência A)

UafB – Uroadherence factor B (Fator de uro-aderência B)

v/v – volume por volume

w/v – peso por volume

β – Beta

RESUMO

Staphylococcus saprophyticus caracteriza-se por ser uma bactéria uropatogênica que causa infecção no trato genito-urinário especialmente de mulheres jovens. Alguns fatores de virulência já foram elucidados, no entanto, pouco se conhece do modo pelo qual esta bactéria acomete o hospedeiro humano. A uréase foi o primeiro fator de virulência descrito em *S. saprophyticus*, sendo responsável pela alcalinização do pH da bexiga de pacientes contaminados. Este estudo é o pioneiro tratando-se de *S. saprophyticus* na abordagem da proteômica e imunoproteômica do perfil de proteínas secretadas (exoproteoma) por esta bactéria. Um total de 44 proteínas secretadas inéditas foram detectadas por espectrometria de massas. Dentre as proteínas encontradas, cinco delas possuem papel fundamental na via glicolítica: triose-fosfato isomerase (TPI), enolase (ENO), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e glicose-6-fosfato isomerase (GPI), no entanto, seu papel como proteína “moonlighting” já foi observado em diversos microrganismos. Através da imunoproteômica, foi possível detectar 18 espécies proteicas que reagiram no Wester-blotting, e 5 delas puderam ser identificadas por espectrometria de massas. A espécie proteica mais abundante identificada como imunogênica em *S. saprophyticus*, foi a transglicosilase IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A*), sendo bem descrita em *S. aureus* como um fator de virulência. Outra proteína abundante identificada como imunogênica foi a Ssa (*Staphylococcal secretory antigen*), no qual, foi identificada em 3 isoformas. A enolase também foi identificada no imunoproteoma de *S. saprophyticus*. Foi possível concluir através destes resultados que *S. saprophyticus* possui uma gama de proteínas extracelulares capazes de promover a adaptação desta bactéria, algumas delas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo/nitrosativo (SOD e AhpC), além de possuir proteínas que tem a característica de incitar a resposta imune humoral de camundongos BalbC. Isso tudo nos leva a hipotetizar que *S. saprophyticus* possui mecanismos de defesa e virulência a fim de se proteger contra estresses exteriores e mecanismos para promover a patogênese no trato genito-urinário.

Palavras-chave: *Staphylococcus saprophyticus*, exoproteoma, imunoproteômica, transglicosilase IsaA e virulência.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e FAPEG.

ABSTRACT

Staphylococcus saprophyticus is characterized as uropathogenic bacteria that causes urinary tract infections especially in young women. Some virulence factors were elucidated, however, little is known about how this bacteria install itself at host human. The urease was the first virulence factor described in *S. saprophyticus*, being responsible by increasing of the bladder pH in infected patients. This is the first study about *S. saprophyticus* in proteomics and immunoproteomics perspective of the secreted proteins (exoproteome) of this bacterium. A total of 44 new secreted proteins were detected by mass spectrometry. Among the proteins found, five of them have a crucial role in the glycolytic pathway: Triosephosphate isomerase (TPI), enolase (ENO), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), however, its role as moonlighting proteins have been observed in various microorganisms. Through of the immunoproteomics, it was possible to detect 18 protein species that reacted onto Western-blotting, and 5 of them could be identified by mass spectrometry. The most abundant protein specie identified as immunogenic in *S. saprophyticus*, it was transglycosilase IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A*), being it well described in *Staphylococcus aureus* as virulence factor. Another abundant protein found as immunogenic was Ssa (*Staphylococcal secretory antigen*), which, it was identified under 3 isoforms. The enolase was the last protein identified at immunoproteome of *S. saprophyticus*. It was possible to conclude from these results that *S. saprophyticus* has a wide of extracellular proteins capable to promote bacteria adaption, and some of them are involved in oxidative/nitrosative stress (SOD and AhpC), besides possess proteins that have the capacity to incite the humoral immune response in BalbC mice. All this lead us to hypothesize that *S. saprophyticus* have defense and virulence mechanisms in order to protect itself against extracellular stresses and appropriate mechanisms to promote urinary tract infections.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*, exoproteome, immunoproteomics, transglycosilase IsaA and virulence.

Financial support: CNPq, CAPES and FAPEG.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. O gênero *Staphylococcus* e a espécie *Staphylococcus saprophyticus*

O gênero *Staphylococcus*, pertence ao filo *Firmicutes*, da classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Bacillales* e família *Staphylococcaceae*. Atualmente possui 49 espécies e 26 subespécies (<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>), conforme a última classificação da LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2014). São cocos Gram-positivos e não possuem endósporos, têm metabolismo aeróbio, podendo ser anaeróbios facultativos. Podem apresentar atividade de coagulase, caracterizando-se espécies coagulase-positiva, assim como em sua grande maioria, existem espécies com ausência da atividade de coagulase, caracterizando as espécies coagulase-negativa (SCN) (Shaw et al. 1951; Baird-Parker 1963; Kloos & Bannerman, Tammy 1994). As células de *Staphylococcus* spp. tem tamanho aproximado de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e agrupados irregularmente em forma de cachos (Santos et al., 2007), e possuem temperatura ótima de crescimento de 30-37°C (Shaw et al. 1951; Santos et al. 2007). Estes microrganismos podem se tornar patógenos para os seres humanos devido ao fato de algumas espécies serem comuns da microbiota humana, principalmente nas mucosas e pele (Kloos & Bannerman, Tammy 1994; Santos et al. 2007).

Staphylococcus aureus é uma das bactérias com maior nível de atenção da saúde pública mundial sendo a espécie do gênero com mecanismos de virulência bem descritos. Esta espécie é coagulase positiva e apresenta tropismo principalmente para tecidos epidérmicos e dérmicos, em erupções cutâneas podendo se espalhar facilmente no hospedeiro debilitado, podendo causar outras patogenias, como pneumonia, impetigo, mastite, meningite, endocardite, ou até um quadro de septicemia em pacientes imunocomprometidos (Santos et al. 2007; Dreisbach et al. 2011).

Estudos proteômicos recentes em *S. aureus*, têm sido realizados para identificar proteínas associadas ao processo de infecção e patogênese neste modelo. Tem sido descritos trabalhos identificando proteínas integrais ou transmembranas, proteínas modificadas por lipídeos (lipoproteínas), proteínas de parede celular, proteínas expostas na face extracelular da parede celular (surfaco) e as proteínas secretadas para o meio extracelular. O conjunto de proteínas secretadas para o ambiente

extracelular de um organismo unicelular é denominado como secretoma ou exoproteoma (Dreisbach et al. 2010; 2011).

Em *S. aureus* já foram observadas proteínas expressas na parede celular e exoproteoma que contribuem na sua patogênese e virulência, que inclusive são atualmente fatores de virulência bem descritos na literatura. Dentre as proteínas detectadas se encontram: Proteínas ligantes a penicilina (PBP's 1, 2 e 4), proteína A, β -lactamase, hemolisinas, catalase, coagulase e proteínas ligantes a compostos da matriz celular (Dreisbach et al. 2010; 2011; Muthukrishnan et al. 2011). Ainda tem sido proposta a possibilidade do desenvolvimento de vacinas a partir do estudo dessas proteínas expressas na superfície ou no secretoma/exoproteoma, sendo alvos elegíveis no combate ao patógeno (Dreisbach et al. 2011; Bröker & van Belkum 2011).

Várias espécies do gênero *Staphylococcus* spp. podem causar doenças diversas no hospedeiro humano. A espécie *Staphylococcus saprophyticus* apresenta grande relevância para a saúde pública, pois é comumente encontrado no trato genito-urinário de mulheres jovens, podendo causar complicações urinárias (Gatermann & Marre 1989; Gatermann et al. 1989; Kloos & Bannerman, Tammy 1994; Kuroda et al. 2005; Sankinc et al. 2005; Widerström et al. 2007; Higashide et al. 2008; Kleine et al. 2010; King et al. 2011; Widerström et al. 2012). Esta espécie foi relatada pela primeira vez por Fairbrother em 1940, pela observação da não atividade de coagulase e pela não fermentação do manitol (Shaw et al., 1951).

S. saprophyticus é uma bactéria coagulase-negativa (SCN) que causa cerca de 40% das infecções no trato genito-urinário (TGU) em mulheres jovens sexualmente ativas, ficando somente atrás da *Escherichia coli*, sendo os sintomas de infecção de ambas as espécies indistinguíveis (Raz et al. 2005; Widerström et al. 2007; Park et al. 2010; King et al. 2011). Essa espécie é raramente resistente aos antibióticos contra bactérias Gram-positivas, entretanto, já têm sido relatadas cepas de *S. saprophyticus* resistentes a novobiocina (Eiff et al. 2002; Vickers et al. 2007), fosfomicina (Kahlmeter, 2003) e oxacilina (Higashide et al., 2008). O genoma de *S. saprophyticus* (ATCC 15305) foi seqüenciado por Kuroda e colaboradores, em 2005. O genoma dessa bactéria compreende 2.516.575 pb, apresentando 33,2% de conteúdo guanina e citosina (G+C). Dispõem também de 2.446 ORFs (Open Reading Frame). Quando comparados os genomas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram detectadas 582 (23,8%) ORFs específicas de *S. saprophyticus*, além de possuir dois plasmídios (pSSP1 e pSSP2), com tamanhos de 38,4 e 22,9 kb, respectivamente (Kuroda et al., 2005). Diferentemente de *S. aureus*, a

espécie *S. saprophyticus* produz uma cápsula polissacarídica, desprovida de poli-N-acetilglicosamina (PNAG) ou ácido poliglutâmico, que é resultado do loci gênico *SCCcap1*, similar ao de *S. aureus* (Luong et al. 2002; Kuroda et al. 2005; Park et al. 2010).

Como apontado acima, *S. saprophyticus* não apresenta resistência a muitos antibióticos que são geralmente utilizados contra bactérias Gram-positivas, no entanto, no lugar do cassette de resistência apresentado por *S. aureus* (*SCCmec*), *S. saprophyticus* possui dois cassetes estafilocócicos, denominados de *SCC_{15305RM}* e *SCC_{15305cap}* (Kuroda et al., 2005). Estes cassetes não possuem genes vinculados à resistência a antibióticos, mas é composto por genes que codificam recombinases (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*) e genes que codificam proteínas relacionados a enzimas de restrição (*hsdS*, *hsdM* e *hsdR*) (Kuroda et al. 2005; Park et al. 2010). O cassette *SCC_{15305cap}*, presente em *S. saprophyticus*, consiste de um óperon de proteínas relacionadas com a síntese de uma cápsula polissacarídica. O óperon é disposto em 13 ORFs, sendo que o gene *gtaB* se encontra *upstream* do óperon e codifica para uma UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase. As outras proteínas do cassette (*capABCDEFGHIJKL*), são codificantes no mesmo sentido, exceto *capJ* (Park et al. 2010) [Ver Figura 1]. Apesar do cassette *SCC_{15305RM}* não ter relação nenhuma com a resistência a antibióticos, Higashide et al. (2008), descreveu no seu estudo, 101 isolados oriundos de pacientes contaminados por *S. saprophyticus*, sendo que 8 deles possuíam resistência a oxacilina ($MIC_{50} \geq 0,5\mu g/mL$), e apresentavam o cassette de resistência *mecA*, confirmado por experimentos de Southern-blot e PCR. Isso reflete em uma plasticidade fenotípica que esta bactéria pode exercer, levantando-nos a refletir em uma possível multirresistência que futuramente pode ocorrer.

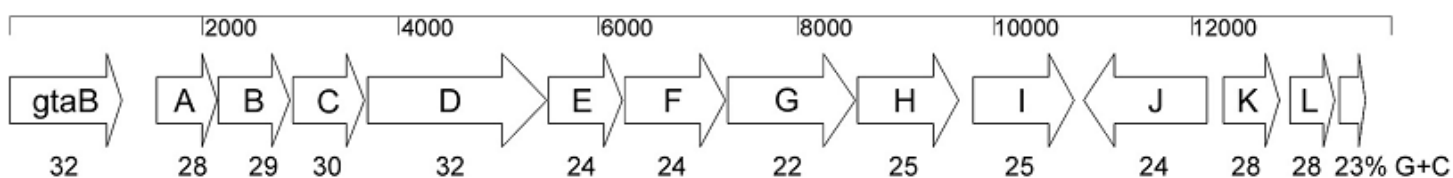


Figura 1. Óperon relacionado à síntese da cápsula polissacarídica em *S. saprophyticus*. *gtaB*, é um gene *upstream* do óperon que codifica para UTP-glicose-1-fosfato-uridiltransferase; o cluster do cassette estafilocócico *SCC_{15305cap}*, é composto de genes que codificam UDP-D-FucNAc (*capD* e *capL*), UDP-FucNAc transferase (*capK*), UDP-glicose-6-desidrogenase (*capI*) e várias glicosiltransferases (*capE*, *capF*, *capG*, *capH* e *capJ*). A orientação de *capJ*, é oposta aos demais genes do óperon, e aparentemente *capL* é um gene truncado. O cluster *capABCD*, é conservado entre as espécies *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus*. A porcentagem do conteúdo G+C de cada gene está abaixo da seta. [Figura obtida do artigo: Park et al. Characterization of the structure and biological functions of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Bacteriology*, 192(18), pp. 4618-4626, 2010].

1.1.1. Fatores de virulência em *S. saprophyticus*

Um dos primeiros fatores de virulência descrito em *S. saprophyticus*, foi a enzima urease (Gatermann & Marre 1989; Gatermann et al. 1989), sendo evidenciada a sua importância como fator de virulência tendo em vista que a expressão da proteína contribui para a invasão em bexiga de modelos murinos (Gatermann & Marre 1989; Gatermann et al. 1989). Esta enzima está localizada no óperon *ureABCDEFG*, em um grupo de genes na mesma orientação do cromossomo (Kuroda et al., 2005), e possui a capacidade de converter ureia em amônia e dióxido de carbono, favorecendo a proliferação e invasão com a alcalinização do pH ácido da bexiga de pacientes contaminados (Gatermann et al. 1989). Devido a este aumento do pH da bexiga, há a precipitação de estruvito e carbonato-apatita (Gatermann et al. 1989), o que pode levar a formação de pedras na bexiga (Rosenstein et al. 1981; Mobley & Hausinger 1989) e pielonefrite (Braude & Sieminski 1960; Mobley & Hausinger 1989; Raz et al. 2005)

Após a caracterização da urease como sendo um dos principais fatores de virulência em *S. saprophyticus*, outros estudos foram cruciais para elucidar os possíveis mecanismos que este microrganismo possui para proliferar e invadir o tecido uroepitelial de um hospedeiro. Algumas adesinas foram caracterizadas e apontadas como mediadoras do processo infeccioso em pacientes acometidos por esta bactéria. Dentre elas, Ssp (*Staphylococcus saprophyticus surface-associated protein*) foi uma das primeiras adesinas descritas (Gatermann, Kreft, et al. 1992). Neste estudo ela foi caracterizada na cepa 7108, apresentando um peso molecular de 95kDa, ausência da atividade de hemaglutinação, sendo apontado como um fator de superfície que estaria facilitando a adesão em células eucarióticas. Esta proteína não está presente em todas as cepas avaliadas, podendo contribuir para as diferenças de capacidade de adesão no tecido do hospedeiro observada entre cepas (Gatermann et al., 1992b). Algum tempo mais tarde, foi adicionada outra função para esta proteína, tendo atividade de lipase, quando esta estava na presença de um substrato adequado, no entanto, ela não apresenta afinidade por colágeno (Sankinc et al., 2005).

Gatermann, Kreft, et al. (1992), caracterizaram outra adesina, a hemaglutinina, que foi observada nas cepas 7108 e CCM83, na presença de EDTA, sendo uma proteína de superfície que possui um peso molecular 160kDa, e tem a capacidade de hemaglutinação de eritrócitos, devido ao reconhecimento de proteínas integrais com pesos molecular de 21kDa e 60kDa presentes na membrana (Meyer et al.,

1996). Em outros estudos, a proteína de 160kDa também exerce papel de autolisina, exercendo papel fundamental de divisão celular, sendo codificado pelo gene *Aas* em *S. saprophyticus* (Hell et al., 1998), e com propriedade também, de se ligar a fibronectina (Gatermann & Meyer 1994; Meyer et al. 1996; Hell et al. 1998).

Em um estudo realizado por Sankinc et al. (2006), foi elucidado uma proteína em *S. saprophyticus* 7108, com domínios repetidos de serina-aspartato, que está ancorada a parede celular por um motivo LPXTG e já observado em outros estafilococos, que tem afinidade ao colágeno. Esta proteína é denominada SdrI (*Serine-Aspartate Repeat Protein I*) em *S. saprophyticus*, e foi observado uma ligação atenuada ao colágeno em mutantes 7108 para o gene *sdrI*, e a restituição do mesmo, favorecia o tropismo de *S. saprophyticus* ao colágeno. Ainda neste mesmo estudo, foi ponderada a capacidade da cepa CCM83 poder estar se ligando ao colágeno. Após a incubação, foi visto que esta cepa possui pouca afinidade por colágeno, o que foi validado através da PCR comparativa entre as cepas 7108 e CCM83, no qual concluiu que dentre os 123 isolados, a cepa 7108 possui o gene do fator de uro-aderência A (*uafA*) e o gene para a proteína com domínios repetidos de serina-aspartato (*sdrI*), enquanto a cepa CCM83 possui somente o gene para o fator de uro-aderência A (*uafA*). Sendo assim, o crescimento de *S. saprophyticus* na presença do colágeno, era favorecido devido a presença de SdrI, e não de UafA (Sankinc et al. 2006).

O fator de uro-aderência A (UafA) é uma adesina característica da espécie *S. saprophyticus* que favorece a aderência no trato genito-urinário através da hemaglutinação, o que facilita a invasão das células uroepiteliais (Kuroda et al., 2005). Esta proteína é caracterizada por ser ancorada a parede celular e possuir uma região denominada de A, correspondendo a 72kDa da proteína, ainda provendo de domínios N (N1, N2 e N3), que é seguida por uma região denominada de B, que corresponde a 13kDa, e uma região R, que é rica em Ser-Glu, correspondendo a 148kDa, e uma sequência com um motivo LPXTG, que se ancora a membrana de *S. saprophyticus* (Matsuoka et al., 2011). Esta proteína aparentemente apresenta uma característica de se comportar como outra adesina, e está classificada como uma MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) singular que está intrinsecamente ligada ao peptidoglicano de *S. saprophyticus*, capaz de hemaglutinação em eritrócitos (Kuroda et al. 2005; Matsuoka et al. 2011), no entanto, essa característica pode ser “mascarada” por cepas de *S. saprophyticus* encapsuladas (Kuroda et al. 2005; Park et al. 2010).

Outro fator de uro-aderência que foi elucidado recentemente na cepa MS1146, foi a pertencente da classe B, UafB. Ela também se mostrou, apresentando papel de adesina com motivo LPXTG, tendo um tropismo por células uroepiteliais humanas do que em células de bexiga de ratos, e possui uma alta afinidade por fibronectina e fibrinogênio. É uma proteína proveniente do plasmídeo pSSAP1, tendo sido apontado a possibilidade de ser um transposon (King et al., 2011). Além disso, neste estudo foi levantado a possibilidade de UafB estar favorecendo a hidrofobicidade da superfície celular de *S. saprophyticus*, favorecendo a adesão em células uroepiteliais, que embora seja um fator recentemente descrito, já foi observado por Scheneider & Riley (1992).

Recentemente, uma proteína ancorada a parede celular de 73,5kDa, que apresenta resistência a ácido linoleico foi descrita em *S. saprophyticus*. Essa proteína é codificada em *S. saprophyticus* MS1146, pelo plasmídeo pSSAP2, e em *S. saprophyticus* ATCC 15305, é codificada pelo plasmídeo pSSP1, tendo 99% de identidade. SssF (*Staphylococcus saprophyticus surface protein F*) compartilha uma identidade com outras espécies de estafilococos, que também apresentam resistência ao ácido linoleico, como por exemplo SasF de *S. aureus*. Apesar desta proteína ser encontrada em superfície celular e possuir um motivo LPXTG, nenhum indício foi apontado de que ela estaria exercendo um papel de adesina, devido ao fato que modelos murinos infectados com MS1146, e cultivo de células oriundas de carcinoma de bexiga (T24 e 5637), tiveram uma contagem de CFU insignificante. Além disso, mutantes para *sssF* tiveram uma susceptibilidade maior quando expostos ao ácido linoleico. Apesar de não realizar o papel de adesina, SssF possui uma relevância fundamental para a progressão da infecção, visto que o ácido linoleico é um ácido graxo importante na resposta imune inata de um hospedeiro, atuando como antibactericida (King et al., 2012).

1.1.2. Vias de secreção de proteínas em bactérias

Nos últimos anos algumas vias de secreção tem sido observadas em diversas bactérias, principalmente ao grupo de bactérias Gram-negativas, sendo denominadas “*Type Secretion System (TSS)*” (Tseng et al., 2009). Um total de sete vias de secreção foram elucidadas em diferentes espécies de bactérias [Figura 2], sendo elas: (i) T1SS é constituído de ATP-binding cassette [ABC] transporter, Outer Membrane Factors [OMPs] e Membrane Fusion Proteins [MFP] (Delepelaire, 2004), é caracterizado por secretar toxinas, proteases, lipases e hemóforos (Beeckman and Vanrompay, 2010); (ii) T2SS, é conhecido como o sistema Sec-dependente de duas etapas de muitas proteínas importantes para virulência de bactérias patogênicas tais como toxinas e enzimas hidrolíticas com peptídeo sinal na extremidade N-terminal, podendo ser secretada por Sec- ou Tat-translocase (Filloux 2004; Cianciotto 2005). Este sistema de secreção possui proteínas que constituem o translocon Sec (SecDF-SecYEG e YidC) dependente de SecA (ATPase) para efetuar a translocação de proteínas para o meio extracelular, além disso, o translocon Tat (TatA, TatB e TatC) também efetua a secreção de proteínas marcadas por um peptídeo sinal N-terminal rico em Arg (Yen et al. 2002; Dilks et al. 2003; Sibbald et al. 2006); (iii) T3SS, é conhecido como “*injectiossoma*”, que aparentemente possui proteínas de origem evolucionária comum, que constituem sua maquinaria. Sua principal característica é injetar proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira, onde ela pode modular a resposta imune do hospedeiro (Beeckman & Vanrompay 2010; Erhardt et al. 2010); (iv) T4SS é o único sistema de secreção capaz de transportar proteínas relacionadas com ácidos nucleicos ou o próprio DNA, através da parede celular bacteriana para o meio extracelular (Fronzes et al., 2009); (v) T5SS, é um sistema que tem a característica de “*autotransportador*”, pois as proteínas secretadas por este sistema tem a capacidade de formar um barril-beta na extremidade C-terminal, enquanto a N-terminal passa por ela, apesar de ser Sec/Tat-dependente (Henderson et al., 2004); (vi) T6SS, tem uma estrutura análoga ao T3SS e T4SS, no entanto, tem papel fundamental na patogênese, além de se comportar como adesina e invadir o tecido do hospedeiro, promovendo a sobrevivência dentro de macrófagos (Bingle et al. 2008; Cascales 2008); (vii) T7SS, é um sistema especializado de secreção que foi observado inicialmente em micobactérias, no entanto foi evidenciado sua contribuição na virulência de *S. aureus*, apesar de pouco se conhecer deste sistema de secreção (Daleke et al. 2012; Anderson et al. 2013).

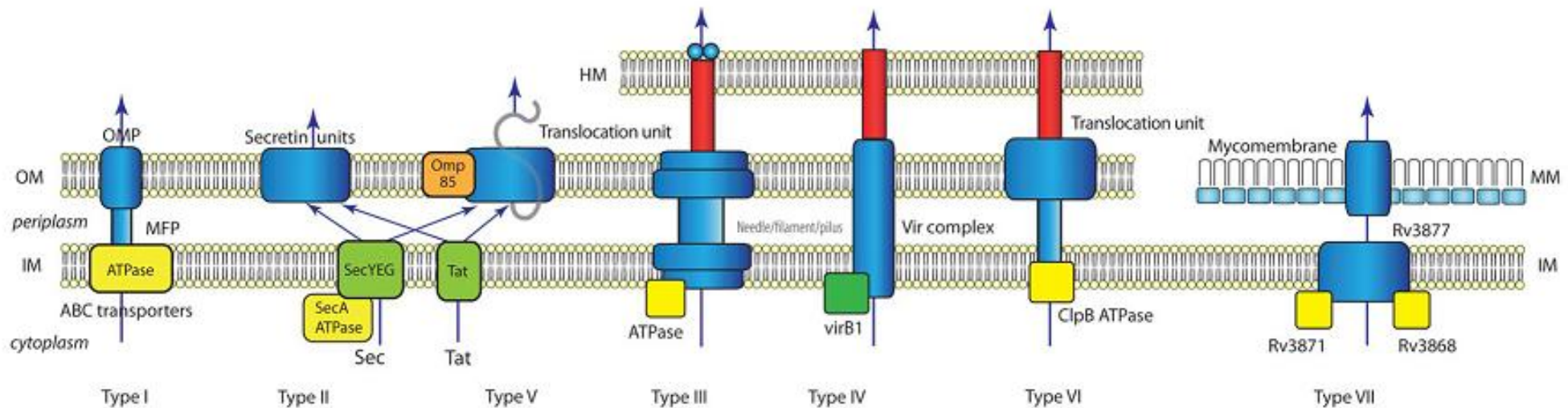


Figura 2. Esquema das vias de secreção conhecidas em bactérias. Type I Secretion System (T1SS), secreta predominantemente toxinas, proteases e lipases para o meio extracelular, e sua maquinaria é composta por ATP-binding protein [ABC], MFP e OMP, enquanto que Type II Secretion System (T2SS), é o sistema Sec-dependente melhor conhecido, que por sua vez também promove a secreção de proteínas necessárias para virulência de patógenos humanos, é constituído por uma ATPase (SecA) e um arranjo trimérico SecYEG. Type III Secretion System (T3SS), no entanto a estrutura de “injetiossoma” permite a secreção de proteínas diretamente na célula do hospedeiro, que modulam respostas imune do hospedeiro. Type IV Secretion System medeia o transporte de DNA e proteínas relacionadas com ácidos nucleicos através da membrana celular para as células eucarióticas, do qual necessita o contato célula-célula. Type V Secretion System (T5SS), possui a característica de autotransporte Sec-dependente, tendo uma proteína auxiliar (Omp85) para secreção de proteínas que contribuem para a virulência e patogenicidade. Type VI Secretion System (T6SS) possui analogia com T3SS e T4SS, e possui uma complexa maquinaria, que é frequentemente relatada por estar envolvida na interação com células eucarióticas, enquanto que o sistema de secreção Type VII Secretion System (T7SS), foi relatado inicialmente em micobactérias, porém tem sido observada sua importância em estafilococos. Pouco se sabe sobre este sistema de secreção, no entanto, já foi relatada sua contribuição na virulência de *S. aureus*, apesar de não apresentar peptídeo sinal. **Legenda:** OM, membrana externa; IM, membrana interna; HM, membrana do hospedeiro; MM, micomembrana; OMP, proteína de membrana externa; MFP, proteínas de fusão da membrana. ATPases e chaperonas são demonstradas em amarelo. [Figura obtida do artigo: Tseng et al. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9 (Suppl. 1), S2, 2009].

1.1.2.1. Sec-translocase e Via Tat (T2SS)

S. aureus é uma das bactérias Gram-positivas que possuem diversas vias envolvidas no transporte de proteínas para a região extracelular já elucidada. Proteínas que necessitam serem secretadas para exercerem algum papel extracelularmente, geralmente são marcadas com um peptídeo sinal na extremidade N-terminal, que após exportação para o meio extracelular, é clivado por uma peptidase sinal (SPase), e o peptídeo sinal é degradado por peptidases do peptídeo sinal (SPPases). Dentre as bactérias melhores estudadas para as vias de secreção, estão *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Tjalsma et al. 2004; Sibbald et al. 2006). Alguns componentes estão envolvidos em diferentes rotas de exportação do citoplasma e em modificações pós-traducionais de proteínas em organismos que possuem os mecanismos de secreção conservados, tais como em *S. aureus* e *S. epidermidis* (Sibbald et al., 2006).

Muitas vias de secreção possíveis tem sido apontadas experimentalmente ou deduzidos de genomas. Uma das vias, que é bem descrita, é a via Sec-dependente, que é responsável pela secreção da maioria das proteínas encontradas no secretoma de *B. subtilis*, e que possivelmente, este mesmo mecanismo de secreção, pode estar envolvido na secreção de proteínas em *S. aureus* (Tjalsma et al. 2004; Sibbald et al. 2006). Proteínas que estão envolvidas na via Sec, possuem um peptídeo sinal que reconhecem SPases do tipo I e II. Em *S. aureus* a SPase do tipo I, possui dois homólogos, denominados SpsA e SpsB. No entanto, a SPase I (SpsB) é a peptidase sinal que está enzimaticamente ativa, e possivelmente está envolvida na viabilidade e crescimento de *S. aureus* (Cregg et al., 1996). A peptidase sinal do tipo II reconhece o mesmo sítio que é reconhecido pela diacilglicerol transferase (*Lgt*), sendo uma enzima essencial na modificação de proteínas a lipoproteínas e fundamental para o reconhecimento de SPase II, como descrito em *E. coli* (Sankaran and Wu, 1994). Além disso, todas as proteínas que são Sec-dependentes, necessitam (a) serem marcadas pela maquinaria de translocação da membrana por chaperonas específicas, (b) translocadas através da membrana pela maquinaria Sec-dependente e (c) sofrer modificações e enovelamento proteico pós-translocacional (Sibbald et al., 2006).

Em *B. subtilis* a chaperona SRP (*signal recognition particle*), já descrita por ser específica na secreção, consiste de um scRNA (*small cytoplasmic RNA*), uma proteína HBsU com afinidade a histona e a proteína Ffh (Sibbald et al., 2006), sendo que *E. coli* demonstrou que as proteínas secretadas nascentes podem ser reconhecidas

por diversas chaperonas citoplasmáticas ou fatores de marcação, tais como Ffh ou fatores Trigger (Eisner et al., 2003). Em *E. coli*, a chaperona SecB, está envolvida no processamento de proteína após a tradução, no entanto ela está ausente em *S. aureus* e *B. subtilis* (Sibbald et al., 2006).

Em *S. aureus* a maquinaria de translocação de proteínas consiste em diversas Sec-proteínas que foram deduzidas do genoma. Apesar disso, o modo de ação dessas proteínas tem sido bem elucidado em *E. coli* (Vrontou & Economou 2004; Plessis et al. 2011; Nijeholt & Driessen 2012). Após a ligação da pré-proteína ao dímero SecA, estas moléculas se ligam ao ATP, resultando em uma alteração conformacional no canal de translocação. Após a hidrólise do ATP, SecA lança a pré-proteína, voltando a sua forma original. Vários ciclos são realizados até que a pré-proteína seja completamente lançada para o meio extracelular. Este canal de translocação é formado principalmente por SecE e SecY, sendo conservados em todas as bactérias (Veenendaal et al., 2004).

Em *E. coli*, o complexo heterotrimérico SecYEG está associado ao complexo SecDF-YajC (Nouwen et al., 2005). Este complexo aparentemente está envolvido na ciclagem de SecA, favorecendo a translocação de proteínas (Plessis et al. 2011; Nijeholt & Driessen 2012). As proteínas que constituem o complexo SecDF possuem 12 domínios transmembrana com 2 alças grandes extracitoplasmática, entre o primeiro e o segundo segmento, e entre o sétimo e oitavo segmentos transmembrana (Nouwen et al., 2005). Em *S. aureus*, ainda não sabe-se se o complexo SecDF-YajC se associa com os sistemas de translocase SecA e SecY (Sibbald et al., 2006). Entretanto, tem sido observado a contribuição do complexo SecDF-YajC, durante a adesão, invasão e citotoxicidade em células de cordão umbilical humano, além disso, mutantes para *secDF* tiveram uma alta concentração de proteínas envolvidas na hidrólise da parede celular e remodelamento do peptidoglicano, além de apresentar virulência atenuada (Quiblier et al., 2013). Após a translocação e processamento das pré-proteínas pelas SPases (I e II), o peptídeo sinal é rapidamente degradado por peptidases do peptídeo sinal (SPPases).

Em *B. subtilis*, foram apontadas duas SPPases, TepA e SppA, sendo estas conhecidas por estarem envolvidas na translocação e processamento das pré-proteínas (Bolhuis et al., 1999), e curiosamente, TepA e SppA não apresentam homologia com *S. aureus* e *S. epidermidis*, de acordo com a busca por homologia em banco de dados (Sibbald et al., 2006). Sendo assim, o mecanismo pelo qual os peptídeos sinais das

proteínas exportadas por esta maquinaria são degradados permanece desconhecido em *S. aureus* e *S. epidermidis*. Após o processamento e translocação das proteínas para o meio extracelular pela maquinaria Sec-dependente, é necessário haver o enovelamento proteico, para evitar que as proteínas expostas a proteases extracelulares e de parede celular se protejam da degradação (Meima et al. 2002; Sarvas et al. 2004) [Ver Figura 3].

A via Tat (*twin-arginine translocation*) existe em muitas bactérias, archea e cloroplastos, e é Sec-dependente. A denominação desta via é devido fato de haver resíduos consenso-duplo do aminoácido arginina no peptídeo sinal, além de ser capaz de exportar proteínas enoveladas usando a força próton-motriz do translocon (Tjalsma et al. 2004; Sibbald et al. 2006). Todas as bactérias Gram-positivas, com exceção de streptomycetes e *Mycobacterium smegmatis*, o translocon é constituído apenas de TatA e TatC (Yen et al. 2002; Dilks et al. 2003). *S. aureus* também apresenta os genes *tatA* e *tatC*, e possivelmente possui uma única TatA-TatC translocase, no entanto sua funcionalidade necessita ser elucidada (Sibbald et al., 2006). Em diferentes espécies bacterianas, TatA, TatB e TatC, apresentam parálogos dentro do genoma que favorece na secreção de cerca de 20% das proteínas extracelulares (Yen et al. 2002; Dilks et al. 2003). Estudos acerca da contribuição da via Tat para secreção em *E. coli*, revelou que a conformação TatA-TatB-TatC é necessário para a exportação de proteínas, no entanto, estudos com mutantes para *tatA* e *tatB*, demonstraram que há uma participação compensatória de TatA quando TatB está ausente, sugerindo uma bifuncionalidade de TatA para o translocon (Blaudeck et al., 2005).

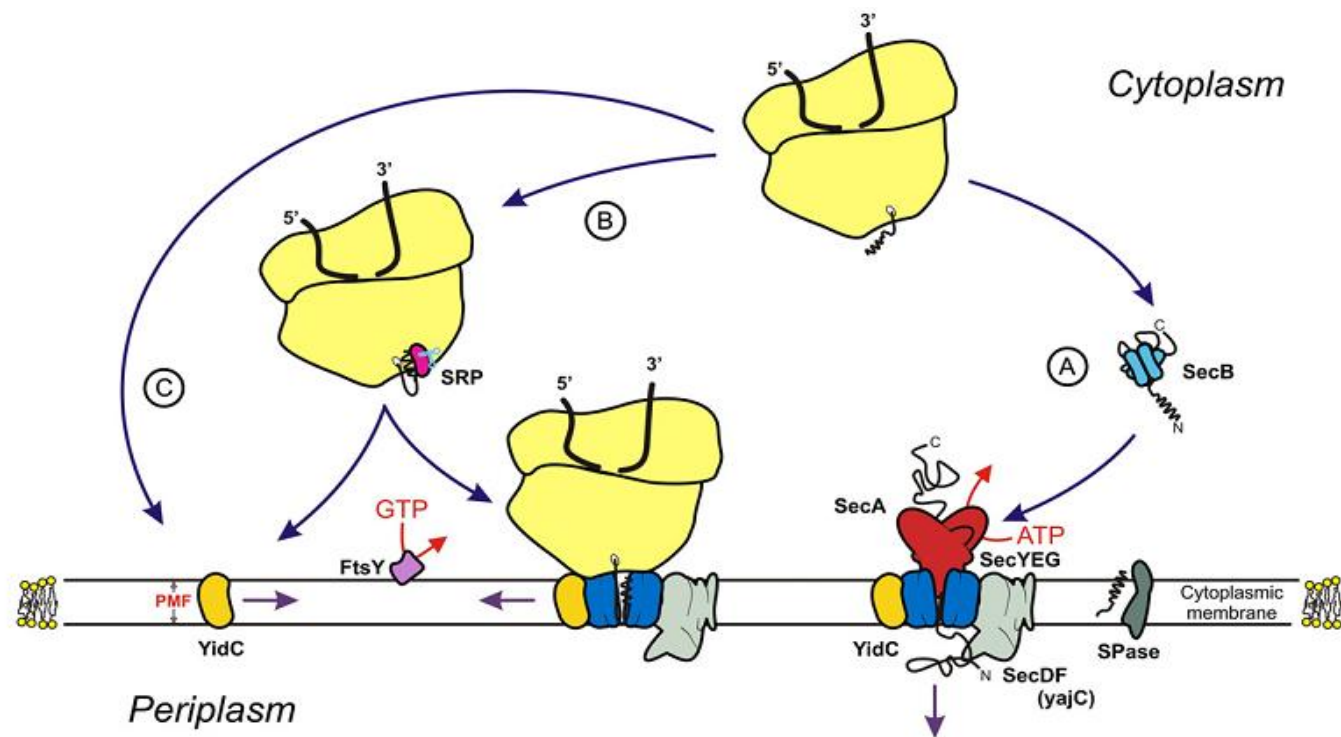


Figura 3. Representação esquemática do sistema de secreção Sec-dependente. O translocon Sec-dependente de bactérias (azul) abrange a membrana plasmática e consiste de SecYEG. SecA (vermelho) atua na periferia citoplasmática. Outras proteínas auxiliares interagem com a translocase YidC (amarelo) e o complexo SecDF (YajC) (cinza claro). Os peptídeos siniais das pré-proteínas são clivados na face periplasmática da membrana por peptidases siniais (SPases). (A) As proteínas sintetizadas no ribossomo (amarelo claro) destinados para secreção são posteriormente marcadas após translocação pela Sec-translocase, que necessita de SecA (ATPase). Por outro lado, a chaperona SecB (azul claro) se liga a pré-proteína, que a mantém em um estado competente de translocação e a marca para o translocon Sec para translocação. (B) Direcionamento co-traducional do ribossomo com cadeias nascentes para o complexo translocase é atingido pela ligação da sequência sinal de algumas pré-proteínas ou uma sequência sinal de ancoragem das proteínas de membrana por SRP (rosa), e o receptor SRP, FtsY (lilás). Proteínas de membrana com domínios periplasmáticos grandes necessitam da presença de SecA para o processo de translocação. YidC interage com a membrana plasmática, à medida que surgem a partir do portão lateral SecYEG. (C) Um conjunto de proteínas de membrana podem se inserir na membrana plasmática via YidC após o direcionamento das cadeias nascentes do ribossomo para YidC. [Figura obtida do artigo: Plessis et al. The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), pp.851-865, 2011].

1.1.2.2. Outras vias de secreção em *Firmicutes*

Outras vias de secreção estão presentes em bactérias, mas nem sempre estão presentes de modo conservado em bactérias Gram-negativas e/ou positivas. A via de transporte ABC, apresenta a característica de secretar bacteriocinas como lantibióticos em *S. aureus* C55, que produz 2 lantibióticos: C55 α e C55 β , que são capazes de inibir o crescimento de outras bactérias, tais como: outras cepas de *S. aureus* e *Micrococcus luteus*, favorecendo o crescimento da bactéria que possui este de tipo de via de secreção (Navaratna et al., 1998). Apesar das evidências apontarem que os lantibióticos sejam secretados por esta via, nenhum estudo experimental acerca desse tipo de secreção foi publicado para *S. aureus* (Sibbald et al., 2006).

A via de exportação de pseudolipinas em *B. subtilis*, é composto por 4 proteínas que possuem peptídeo sinal N-terminal característico que é secretado por esta via: ComGC, ComGD, ComGE e ComGG. Esta via parece estar envolvida na secreção de proteínas com afinidade e captação do DNA, estando dispostas na membrana e parece celular (Tjalsma et al. 2000; 2004). Em *B. subtilis*, a translocação para o meio extracelular ou superfície só ocorre quando as proteínas são processadas por SPases específicas para pseudolipinas [ComC] (Tjalsma et al., 2004). Homólogos de ComC, ComGA, ComGB e ComGC, mas não de ComGD, ComGE e ComGG, estão presentes em 6 cepas de *S. aureus*, sugerindo que nesta espécie, as proteínas do tipo Com não estão envolvidas na captação de DNA, mas em outro tipo de transporte (Sibbald et al., 2006).

Outro sistema de secreção elucidado é denominado como Holinas, que está implicado na exportação de endolisinas que estão envolvidas na degradação do peptideoglicano e na morte celular em bactérias. Os óperons *lgr* e *cid*, foram observados em *S. aureus* exercendo funções na hidrólise de peptideoglicano e tolerância a antibióticos, e mutantes para ambos óperons apresentam as respectivas funções prejudicadas (Groicher et al. 2000; Rice et al. 2003). Tem sido proposto, que as proteínas CidA e LrgA, atuam como hidrolases de peptideoglicano e na tolerância a antibióticos, de maneira análoga ao que ocorre em holinas e anti-holinas, respectivamente (Groicher et al., 2000). Sequências similares foram observadas para os genes codificantes para *cidA* e *lrgA*, em 6 cepas de *S. aureus*, assim como em *B. subtilis* e *S. epidermidis* (Tjalsma et al. 2004; Sibbald et al. 2006).

1.1.2.3. Vias não-clássicas

A secreção de proteínas por via não clássica é caracterizada pelo fato das proteínas exportadas não possuírem um peptídeo sinal conhecido, e serem secretadas de forma Sec-independentes, sendo que este tipo de secreção já foi observado em diversos organismos, dentre eles estão: *B. subtilis*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* (Bendtsen et al., 2005). Em contrapartida, o T7SS (ESS cluster) não é o único meio pelo qual as proteínas podem ser exportadas, e exercerem seu papel na patogênese. As vesículas desempenham uma fundamental contribuição no nicho de colonização, carregando e transmitindo fatores de virulência ao hospedeiro (Kuehn and Kesty, 2005).

A via ESAT-6 foi primeiramente descrita em *M. tuberculosis*, e tem sido proposto que ela possui pelo menos dois fatores de virulência, ESAT-6 (*early secreted antigen target, 6kDa*) e CFP-10 (*culture filtrate protein, 10kDa*), sendo secretadas de maneira Sec-independentes (Sorensen et al. 1995; Berthet et al. 1998). Essa via tem sido apontada por pertencer ao “*Type VII Secretion System*” (T7SS), e por apresentar relevância biológica para *S. aureus* (Anderson et al., 2013). Em *S. aureus*, duas proteínas, denominadas EsxA e EsxB, foram identificadas como sendo secretadas por esta via (Burts et al., 2005). Este tipo de secreção foi observado em diversos organismos, dentre eles estão: *B. subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium acetobutylicum* e *L. monocytogenes* (Pallen, 2002). Os genes *esxA* e *esxB* são parte de um grupo de 6 genes que codificam para proteínas implicadas na translocação de EsxA e EsxB (Sibbald et al., 2006), que foi denominado de *ESS cluster* [ESAT-6 *Secretion System*] em *S. aureus* (Pallen 2002; Burts et al. 2005). O peptídeo sinal das proteínas estafilocócicas EsxA e EsxB são desconhecidos, no entanto a deleção de qualquer um dos genes prejudica a secreção de ambos os produtos gênicos, sugerindo que possivelmente estas proteínas façam parte de um complexo (Burts et al., 2005).

Além de EsxA e EsxB que são secretados pelo *ESS cluster*, outros substratos foram apontados por serem secretados por esta via. EsxA e EsxC parecem interagir como homo- ou heterodímeros, enquanto EsxB se associa preferencialmente por EsxD. Curiosamente, quando há a deleção dos genes pertencentes ao *ESS cluster* *esxC*, *esxB*, *esxD* e *essD*, o nível de expressão para EsxB e EsxC são diminuídas ou instáveis (Anderson et al., 2013). Apesar de alguns estudos tratarem dessa via de secreção, ainda pouco se sabe como o processo de secreção acontece, visto que proteínas secretadas por esta maneira carecem de

peptídeo sinal N-terminal. A disposição do *ESS cluster*, é constituído de proteínas envolvidas em uma suposta maquinaria de secreção, e de proteínas (substratos) que são secretadas por ela (Figura 4).



Figura 4. Representação esquemática de *ESS cluster*. As proteínas com funções definidas são indicadas a seguir: proteínas que são secretadas (vermelho), FtsK SpoIIIE-like ATPase (amarelo), suposta maquinaria de secreção ESS (cinza), proteínas com função desconhecida na cepa USA300 de *S. aureus* (branco) [Figura obtida do artigo: Anderson et al. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 90(4), pp. 734-743, 2013].

As vesículas são o meio pelo qual as bactérias interagem com as outras espécies bacterianas de um determinado nicho, e células eucarióticas (hospedeiro) e seu ambiente. Este tipo de secreção tem sido bem avaliado em bactérias Gram-negativas (Figura 5). Em geral bactérias patogênicas produzem mais vesículas do que bactérias não-patogênicas, devido ao fato de bactérias que causam processos infecciosos possuem fatores de virulência que necessitam serem exportados para a patogênese. Além disso, outro fator crucial para a adaptação e sucesso da infecção, é o nicho onde as bactérias estão, pois, a disponibilidade de oxigênio, ferro e presença de antibióticos, podem prejudicar a produção de vesículas, toxicidade e composição das células bacterianas (Kuehn and Kesty, 2005).

Em bactérias Gram-positivas, pouco é conhecido sobre a secreção de vesículas, muito menos qual o seu papel durante a patogênese. No entanto, recentes estudos sobre este modo de secreção em *S. aureus*, apontaram que vesículas extracelulares, podiam induzir a apoptose de células HEp-2, de maneira dose dependente, enquanto que vesículas lisadas não influenciaram na sua citotoxicidade, sugerindo que é necessário ter as vesículas intactas, para conduzir os fatores de virulência até o hospedeiro, e assim modular a resposta imune (Gurung et al., 2011). Além disso, fatores de virulência conhecidos em *S. aureus*, foram observados dentro das vesículas, tais como proteína A e β -lactamase (Gurung et al. 2011; Lee et al. 2013). A contribuição das vesículas, em relação a resistência a antibióticos também foi observada,

sugerindo que a presença dessas estruturas extracelulares podem ser fatores cruciais para a sobrevivência de bactérias (Lee et al. 2013).

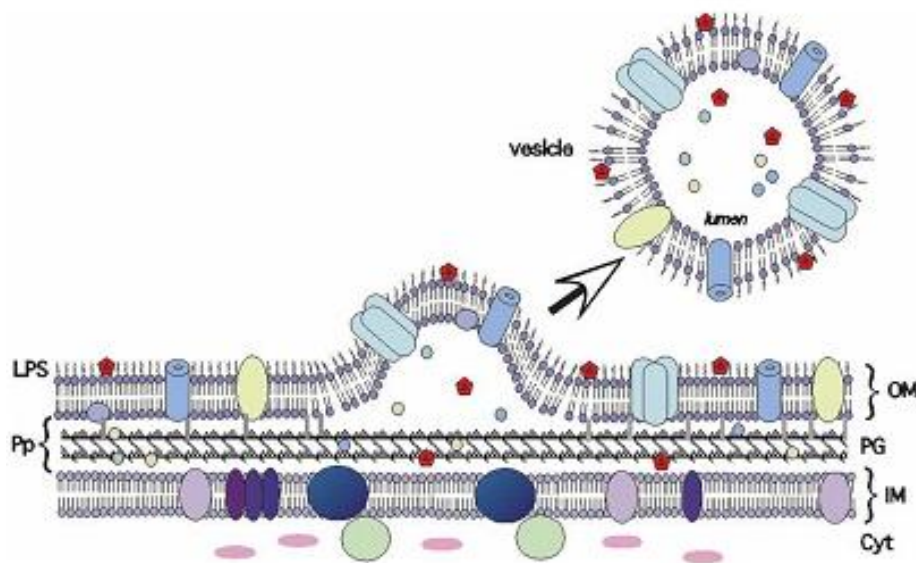


Figura 5. Modelo da biogênese de vesículas em bactérias Gram-negativas. Vesículas são proteolipossomos, que consistem de fosfolipídeos e lipopolissacarídeo (LPS), um conjunto de proteínas da membrana externa, e proteínas oriundas do periplasma (lúmen). Proteínas que aderem a superfície externa da bactéria (vermelho) são associadas com a superfície externa das vesículas. Proteínas e lipídios da membrana interna e o conteúdo citosólico são excluídos da membrana externa da vesícula. As vesículas “brotam” em vários sítios na extensão celular bacteriana onde ocorre a ligação entre o peptidoglicano e a membrana externa são incomuns ou ausentes. Legenda: LPS, lipopolissacarídeo; Pp, periplasma; OM, membrana externa; PG, peptidoglicano; IM, membrana interna; Cyt, citosol. [Figura obtida do artigo: Kuehn and Kesty. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19(22), pp.2645-2655, 2005]

2 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos na atualidade têm utilizado a abordagem da proteômica para propor modelos metabólicos em organismos patogênicos e possibilitar a descoberta de novas proteínas-alvo com relevante papel durante o contato com o hospedeiro humano, possibilitando elucidar proteínas-alvo importantes no processo de proliferação, infecção e disseminação (Rezende et al. 2011; Parente et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011; Monteiro et al. 2012). Dessa forma, esta metodologia amplamente utilizada para identificar e avaliar proteínas, permite a melhor compreensão dos processos de patogênese que ocorre em diferentes microrganismos.

É importante ressaltar que grande parte dos estudos envolvendo o gênero *Staphylococcus*, tem como modelo biológico principal a espécie *S. aureus*. Neste sentido, a análise proteômica de *S. saprophyticus* possibilitará a compreensão dos mecanismos de patogenicidade exercidos por esta bactéria. Espera-se também contribuir com a identificação de proteínas que podem estar relacionadas com a infecção de *S. saprophyticus* em hospedeiro humano. Devido ao fato de ser uma abordagem pioneira, muitas proteínas encontradas no secretoma e em superfície de *S. aureus* não haviam previsão de localização e nem de função biológica (Dreisbach et al. 2010; Muthukrishnan et al. 2011). Desta forma, a identificação de proteínas secretadas e imunogênicas contribuirá para elucidar características e funções a proteínas até então pouco caracterizadas.

Grande parte da literatura sobre *S. saprophyticus* data da década de 80 e 90, principalmente no que se refere a fatores de virulência que foram caracterizados e casos clínicos descritos (Gillespie et al. 1978; Hovellius et al. 1979; Teti et al. 1987; Gatermann & Marre 1989; Rupp et al. 1992; Rupp et al. 1995). Apesar do genoma completo ter sido sequenciado e publicado em 2005 por Kuroda e colaboradores (Kuroda et al., 2005), nenhum estudo têm sido realizados com intuito de analisar o perfil proteômico desta bactéria. Agora, após o sequenciamento do genoma de *S. saprophyticus* e com os dados disponíveis em bancos de dados, tornam-se viáveis estudos proteômicos voltados na identificação de proteínas expressadas por *S. saprophyticus* que são capazes de estimular a resposta imune humoral em modelos murinos sensibilizados com as proteínas secretadas e propor possíveis mecanismos que esta bactéria possui, para invadir o tecido de um hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral;

O presente estudo tem como objetivo principal identificar o perfil do exoproteoma de *S. saprophyticus*, além de apontar proteínas imunogênicas em *S. saprophyticus* utilizando a estratégia da imunoproteômica, viabilizando uma melhor compreensão do modo pelo qual estas proteínas podem favorecer a patogênese no hospedeiro humano.

3.2. Objetivos Específicos;

- i. Obtenção de extratos de proteínas secretadas por *S. saprophyticus*;
- ii. Imunização dos camundongos da linhagem BalbC com exoproteoma total e obtenção dos anticorpos policlonais;
- iii. Obtenção das replicatas dos 2-DE-PAGE e Western-blotting para as análises de imunoproteômica;
- iv. Identificação do exoproteoma de *S. saprophyticus* utilizando nano-ESI-UPLC-MS^E;
- v. Identificação de proteínas imunogênicas apresentadas no Western-blotting utilizando nano-ESI-UPLC-MS^E.

4 MÉTODOS

4.1. Manutenção e cultivo de *S. saprophyticus*

A estirpe utilizada neste trabalho foi *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, isolada a partir de urina humana. A manutenção de *S. saprophyticus* foi realizada em meio BHI com Agar 1% e estocados a -80°C com glicerol 50%. Células de *S. saprophyticus* foram incubadas em 1000 mL meio BHI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) líquido por 18 horas à 150rpm, 36°C, tempo este utilizados em outros estudos (Kuroda et al. 2005; Muthukrishnan et al. 2011). Após este período as células de *S. saprophyticus* foram coletadas por centrifugação a 4000 x g por 10 min, e lavadas duas vezes com PBS 1X e transferidas para 1000 mL de um novo meio BHI líquido e incubadas por mais 3 horas à 150rpm, 37°C.

4.2. Análise das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*

4.2.1. Preparação, precipitação e quantificação de proteínas secretadas por *S. Saprophyticus*

Após o cultivo, as células foram centrifugadas 4000 x g por 10min, e o sobrenadante das culturas foram coletados, e filtrados em membrana de 0,45 µm e 0,22 µm (Millipore®, Bedford, MA, USA), respectivamente. Foi adicionado ao sobrenadante Ácido Tricloroacético (TCA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) em concentração final de 10% e deixado por 16 horas a 4°C para precipitação das proteínas (Choi et al. 2012; Quiblier et al. 2013). O *pellet* protéico foi obtido pela centrifugação do sobrenadante durante 1 hora a 5000 x g 4°C. O *pellet* foi então lavado 3X com acetona gelada, e transferido para o dispositivo de ultrafiltração Amicon (Millipore®, Bedford, MA, USA) em tampão de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50mM pH 8,5 para dessalinização. Após a concentração, a amostra foi quantificada através do método de Bradford (1976), utilizando BSA para a construção da curva padrão (Reed et al., 2011), usando espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

4.2.2. Obtenção dos anticorpos policlonais

A fim de testar a resposta imunogênica em modelo murino, foi inoculado uma quantidade de 500µg de proteínas presentes no exoproteoma suspensas em PBS 1X, em camundongos da linhagem BalbC (n=3) por 3 vezes a cada 15 dias com intuito de ativar o sistema imune do animal, e induzi-lo a produzir anticorpos policlonais correspondentes as proteínas inoculadas. Na primeira inoculação foi utilizado o adjuvante de Freund completo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) em volume equivalente ao da amostra, que foram misturados e administrados via intra-peritoneal, e nas duas últimas foi utilizado o adjuvante de Freund incompleto (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) com a finalidade de potencializar o sistema imune do animal, e administrados da mesma maneira. Um controle negativo foi realizado (n=1), mantendo os mesmos procedimentos descritos acima, sendo que no lugar do exoproteoma total e a utilização do adjuvante de Freund (completo e incompleto), foi inoculado a poliácridamida oriunda dos géis.

Passando-se os 45 dias de sensibilização, os animais foram eutanaziados por asfixia em câmara de CO₂, posteriormente abertos com tesoura estéril, e com o auxílio de uma seringa, foi retirado o sangue total de cada animal com punção do miocárdio. O sangue recuperado foi submetido à centrifugação por 5min a 5000 x g, e o soro foi transferido para um tubo de 1,5 mL (Axygen), posteriormente foi adicionado glicerol com concentração final de 5% e estocados no -20°C.

4.2.3. 2-DE-SDS-PAGE e Western-blotting

A metodologia de 2-DE-SDS-PAGE foi preconizada por O'Farrell (O'Farrell, 1975). A utilização da técnica de Western-blotting acoplada à eletroforese bidimensional tem sido utilizada recentemente (Nieves et al. 2010; Martins et al. 2013). Para realizar o 2-DE-PAGE, foi utilizado um total de 500 µg do exoproteoma, que foi submetido ao 2-D Clean-up kit (GE Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden), com a finalidade de purificar as amostras que seguiu as instruções do fabricante. As proteínas precipitadas foram ressolubilizadas em tampão de reidratação (250 µL), constituído de 7M de ureia, 2M tiourea, 130mM de CHAPS [3-[(3-Colamidopropil-dimetilamonio]-propano-sulfonato)], 0,002% DTT (ditiotreitól) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,5% tampão contendo anfólitos (IPG buffer, GE

Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden). Em sequência, as amostras foram carregadas em sarcófagos limpos, e hidratadas em IPG strips 4-7 13cm (GE Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden) por 41h usando Etta IPGPhor III, com intuito de separar as proteínas por ponto isoelétrico. O programa aplicado para a focalização foi: Step 30V 14h; Step 500V 1h; Step 1000V 1h; Step 2000V 1h; Gradiente 5000V 3h; Gradiente 8000V 8h; Step 8000V e Step 300V 12 h.

Após a focalização das proteínas na primeira dimensão (focalização isoelétrica), as strips foram submetidas ao tampão de equilíbrio [50mM Tris-HCl pH 8,8; 6M ureia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (w/v) de SDS (Sódio Dodecil Sulfato) e traços de azul de bromofenol], contendo 18mM de DTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), que foram incubadas por 40 min sob agitação constante. Após a redução das pontes dissulfeto pelo DTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), as amostras foram incubadas com o mesmo tampão, entretanto contendo 135mM de iodoacetamida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), para alquilação das pontes dissulfeto, sob agitação constante de 40 min. Subsequentemente, concluído o processo de preparação das strips, as mesmas foram colocadas no gel de poliacrilamida 2-DE-PAGE, com marcador de proteínas com pesos moleculares conhecidos, e seladas com agarose 1% (w/v), e levadas as cubas de eletroforese com o tampão de corrida Tris-glicina 1X [25mM Tris HCl pH 8.8, 192mM glicina, 0.1% (w/v) SDS]. Os 2-DE-PAGE foram submetidos a corrida eletroforética a 10°C por 1 hora a 150V e depois por mais 3 h a 200V até o final da corrida.

Após o término da corrida bidimensional, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose em tampão contendo 25 mM Tris-Base, 190 mM glicina, 20% (v/v) metanol e coradas com Rouge-Ponceau para confirmar se a transferência das proteínas apresentadas no gel foi eficiente. Após a conferência, as membranas foram incubadas no tampão de bloqueio [Solução de Tampão de Fosfato Alcalino 1X (PBS; 1.4 mM KH₂PO₄; 8mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; pH 7.3), 5% (w/v) leite desnatado, 0.01% (v/v) Tween 20] em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período as membranas sofreram lavagem com tampão de lavagem [PBS 1X contendo 0,01% (v/v) Tween 20] e posteriormente, incubadas com os anticorpos policlonais, que foram obtidos de camundongos imunizados com o extrato proteico total (exoproteoma), que foram diluídos no tampão de leite desnatado 5% (w/v) e PBS 1X na proporção de 1:2000 (v/v), e posteriormente lavados novamente por três vezes com o tampão de lavagem. As membranas serão incubadas com o

anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina na proporção de 1:5000 (v/v) [Imunoglobulina G anti-mouse (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e revelado com BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate) e NBT (nitroblue tetrazolium) (Rezende et al. 2011; Parente et al. 2011).

Outros géis foram feitos e corados pelo kit de coloração pela prata (PlusOne™ Silver Staining Kit, GE Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden), que seguiu as instruções do fabricante, com a finalidade de excisar os spots correspondentes que apareceram nas membranas do Western-blotting para identificação por nano-ESI-UPLC-MS^E.

4.2.4. Preparação de amostra e Digestão *in gel*

Os *spots* das proteínas que se apresentaram imunogênicas foram selecionados manualmente. Quando houve a necessidade, dois ou mais *spots* dos géis foram excisados, com a finalidade de aumentar a concentração da amostra e facilitar as identificações. Para retirada da coloração pela prata, os *spots* foram descorados em 15 mM de ferricianeto de potássio e 50 mM de tiosulfato de sódio (Gharahdaghi et al., 1999) por 5 min e lavados 3 vezes com água Milli-Q. O procedimento para a digestão das proteínas foi realizado manualmente como previamente descrito (Rezende et al., 2011). Os spots foram desidratados com 100 µL de acetonitrila (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 5 min e, após a solução ser retirada, os *spots* foram deixados no *speed vacuum* até secarem completamente. Os spots foram reduzidos com 10 mM DTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 hora. O sobrenadante foi retirado e os *spots* foram alquilados com 55 mM de iodoacetamida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) ao abrigo da luz. Os spots sofreram lavagem com 100 µL de solução contendo 25 mM de NH₄HCO₃ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 10 min agitando em vortex. Em seguida o sobrenadante foi retirado e adicionado 100 µL de uma solução contendo 25 mM de NH₄HCO₃/50% ACN (v/v), em constante agitação em vortex por 5 min. Esse procedimento foi repetido três vezes. Após a solução ser retirada as amostras foram desidratadas no *speed vacuum*. Finalmente, as amostras foram reidratadas em 30 µL de tripsina a 10 ng/µL (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega, Madison, WI, USA) durante 10 min a 4°C. Após a remoção do excesso de tripsina (Promega, Madison, WI, USA) foi adicionado 25 µL de solução de 25 mM de NH₄HCO₃ às amostras em gel que prosseguiu uma incubação à 37°C por 16 h. Após a digestão, o sobrenadante foi retirado e colocado em

tubos novos e limpos. Aos *spots* de géis foram adicionado 50 μ L de solução de 50% (v/v) de acetonitrila (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A solução foi misturada em vortex por 10 min por três vezes. O sobrenadante foi adicionado aos tubos anteriores contendo a mistura de peptídeos. Os tubos contendo os peptídeos trípticos foram deixados no *speed vacuum* até secarem completamente e, em seguida, os peptídeos foram ressuspensos em 10 μ L de água Milli-Q. Para concentrar e dessalinizar as amostras dos *spots* foi utilizada a ponteira de cromatografia ZipTip C18 (Millipore®, Bedford, MA, USA). Após dessalinização as amostras dos peptídeos recuperados foram submetidas à secagem por *speed vacuum*. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formiato de amônio 20mM, e transferidas para um frasco de recuperação total ou “total recovery vial” (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

4.2.5. Preparação e digestão das amostras proteicas para nano-ESI-UPLC-MS^E

Para a identificação do exoproteoma total, foi utilizada uma quantidade de 200 μ g/ μ L de proteínas. A amostra foi suspensa em 50 μ L de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM pH 8,5 e adicionado 25 μ L de RapiGest SF 0,2% (Waters Corporation, Milford, MA, USA) como agente surfactante da amostra (Murad et al. 2011; Kilpatrick et al. 2012), levando ao termobloco por 15 min à 80°C. Para redução das pontes dissulfeto, foi adicionado as amostras 2,5 μ L de DTT 100mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), vortex e spin rapidamente e levado ao termobloco durante 30min à 60°C. Posteriormente, foi adicionado as amostras 2,5 μ L de iodoacetamida 300mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para alquilação das proteínas que foram reduzidas por DTT, que ficaram por 30min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para a digestão tríptica, foi utilizada a Tripsina da Promega (Waters Corporation, Milford, MA, USA), adicionando-se 20 μ L da solução na amostra e deixado no termobloco à 37°C por 16 horas. Após a digestão tríptica, foi adicionado 10 μ L de uma solução de TFA 5% para hidrolisar o RapiGest SF (Waters Corporation, Milford, MA, USA), deixando as amostra por mais 90min em termobloco à 37°C. Após este tempo, submeteu-se as amostras à centrifugação 14000 x g durante 30min 6°C para precipitar os resquícios do RapiGest SF (Murad et al. 2011).

Após a digestão tríptica as amostras foram levadas ao *speed vacuum* por 4 horas, para secagem. Depois de secas, as amostras foram transferidas individualmente para um

frasco de recuperação total ou “total recovery vial” (Waters Corporation, Milford, MA, USA). As amostras foram ressuspensas em 20 μ L de uma solução contendo 20 mM de formiato de amônio, e 200fmol de fosforilase b (MassPREPTM protein, Waters Corporation, Milford, MA, USA) que é utilizado na cromatografia líquida como normalizador/padrão interno da amostra (Gilar et al. 2005; Geromanos et al. 2009; Li et al. 2009; Murad et al. 2011).

4.2.6. Instrumentação do nano-ESI-UPLC-MS^E

A separação dos peptídeos tripticos por nanoscale-LC foi realizado com o aparelho nanoACQUITY system (Waters Corporation, Milford, MA, USA), equipado com uma pré-coluna Trap Symmetry C18 5 μ m, 180 μ m x 20mm, uma coluna XBridge C18 5 μ m, 300 μ m x 50mm e uma coluna analítica 1,7 μ m, 100 μ m x 100mm de fase reversa (RP) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). As amostras foram conduzidas para a primeira coluna através da injeção de 1 μ L da amostra, que foi inicialmente transferida para uma solução de ácido fórmico aquoso 0,1% para a pré-coluna, em uma taxa de fluxo de 4 μ L/min por 3 min. A fase móvel A, era constituída de água e 0,1% de ácido fórmico enquanto que a fase móvel B era constituída de água com 0,1% ácido fórmico em acetonitrila. Depois da dessalinização e pré-concentração, os peptídeos foram eluidos a partir da pré-coluna para a coluna analítica e separado por um gradiente de 3-40% da fase móvel B por 90min numa taxa de fluxo de 300nL/min, seguido por 10min de lavagem com 90% da fase móvel B. A coluna foi reequilibrada nas condições iniciais por 20 min. A temperatura da coluna foi mantida por 35°C. O composto para *lock mass*, GFB com o auxílio de uma bomba do sistema de LC a 0,4 μ L/min em uma concentração de 200fmol/mL para a referência da fonte NanoLockSpray do espectrômetro de massa. As amostras foram obtidas e analisadas em triplicata (Li et al. 2009; Murad et al. 2011).

O modelo de espectrômetro de massa utilizado foi o Synapt MSTM com quadrupolo híbrido/ mobilidade iônica/ tempo de voo (ToF) (Waters Micromass, Manchester UK). A acurácia dos dados de massa do LC-MS foram coletados no modo de aquisição de baixa e elevada energia de colisão (LC-MS^E). O tempo de aquisição dos espectros em cada modo foi de 1,5s com 0,1s de atraso. No modo de baixa energia de MS, os dados foram coletados com uma energia de colisão constante de 4 eV. No modo de alta energia de MS, a energia de colisão variou de 15 para 40 Ev durante cada 1,5s de integração. Um ciclo de

dados nestas configurações foram adquiridas a cada 3.2s. A fase reversa foi aplicada ao analisador de massa quadrupolo para ajustar cada íon a partir de m/z 300 para 2000, que foi eficientemente transmitida assegurando que qualquer íon observado nos dados de LC-MS inferior do que m/z 300 tivessem sido analisados pela dissociação estivessem sido excluídos. Para todas as medições, o espectrômetro de massa foi operado no modo V com a resolução típica de pelo menos 10000 FWHM (*Full-Width Half-Maximum*). Todas as análises foram realizadas no modo *Electrospray Source Ionization* (ESI). O analisador do *Time of flight* (ToF), ou tempo de voo do espectrômetro de massa foi calibrado externamente com GFB (Murad et al. 2011). Para a análise dos peptídeos obtidos através dos spots dos géis 2-D, foi utilizada a mesma metodologia exposta acima.

4.2.7. Processamento dos dados e identificação de proteínas

Os dados de MS foram obtidos a partir de LC-MS^E foram processados e pesquisados no servidor ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.4 (Waters Micromass, Manchester UK). As proteínas foram identificadas usando o software com base na contagem dos íons detectados na contagem do algoritmo e a busca da “Glycine max database” com MassPREP padrão da digestão com sequências no UniProtKB/Swiss-Prot (Phosphorylase – P00489 – PHS2_RABIT) foram acrescentados ao banco de dados. As identificações e os dados quantitativos foram gerados utilizando os algoritmos dedicados contra um banco de dados espécie-específico no banco de dados do UniProt (Murad et al. 2011).

A normalização dos parâmetros, como: detecção dos íons, *clustering*, e escala logarítmica foram realizados no PLGS com uma expressão^E de licença instalada. A intensidade das medições foi ajustada tipicamente para as modificações fixas da C-carbamidometilação e oxidação da metionina. Os componentes tipicamente agrupados com uma precisão de massa em 10ppm e uma tolerância de 0,25min contra o banco de dados, gerando uma massa teórica de íon precursor com no mínimo um peptídeo correspondente. O alinhamento dos íons precursores de alta energia e baixa energia foram conduzidos com uma precisão de 0,05min. Uma clivagem perdida foi permitida. A tolerância do fragmento do íon precursor foi detectada automaticamente. A identificação de proteínas seguiu o critério de inclusão e detecção de pelo menos três íons fragmentados por peptídeo e a determinação de pelo menos um peptídeo por proteína, e a identificação das proteínas foi permitida com no

máximo 4% de falso-positivo com taxa de cobertura realizada em triplicata experimental. Para a análise e identificação das proteínas e nível de quantificação, a intensidade observada foi normalizada através do padrão interno utilizado (Murad et al. 2011).

4.2.8. Análise *in silico* das proteínas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus*

Os dados gerados foram tabulados em Microsoft Office Excel de acordo com a sua localização celular de acordo com o algoritmo LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatepdb/cgi-bin/locatepdb.py>), como descrito por Zhou et al. (2008) Os algoritmos SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), foram os algoritmos utilizados para apontar a possibilidade de uma secreção Sec-dependente (via clássica) e/ou Sec-independente (via não-clássica), como descrito anteriormente (Bendtsen et al. 2004; 2005). O banco de dados do UniProt (<http://www.uniprot.org/>); NCBI/BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); MIPS (<http://pedant.gsf.de/>) e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), foram utilizados principalmente para as análises de identidade, função celular desempenhada, predição para peptídeo sinal e busca por homologia em *S. aureus*.

4.3. Comitê de ética

O trabalho foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CoEP) da Universidade Federal de Goiás sob o N°047/13.

5 RESULTADOS

5.1. Otimização da extração das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*

Uma das grandes dificuldades em se trabalhar com o secretoma/exoproteoma de qualquer microrganismo é o fato de reagentes utilizados no preparo do meio de cultivo estar presentes na amostra, além de lipídeos e carboidratos, podendo fazer que a amostra tenha uma dosagem superestimada (Zaia et al., 1998). Por esta razão, foram testados os métodos de extração por concentração em filtro Amicon de 3kDa (Millipore®, Bedford, MA, USA) e de concentração por TCA (ácido tricloroacético). Optou-se por utilizar o TCA 10% para precipitação e acetona para lavagem das amostras, conforme descrito em materiais e métodos, tendo em vista que as amostras apresentaram-se menos viscosas e foram solubilizadas com mais eficiência (dados não mostrados).

5.2. Identificação das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*

No total foram identificadas 44 proteínas secretadas por *S. saprophyticus* cultivado em meio BHI (Tabela 1). Dentre estas proteínas, foram identificadas a proteína transglicosilase IsaA (*immunodominant staphylococcal antigen A*) (Sibbald et al. 2006; Stapleton et al. 2007; Dreisbach et al. 2010; Visutthi et al. 2011) e as transglicosilases SceD (1-3) (Sibbald et al. 2006; Stapleton et al. 2007). Essas proteínas além de serem fundamentais na clivagem entre N-acetilglicosamina (NAcGln) e N-acetilmurâmico (NAcMur) do peptideoglicano, e têm sido observada a sua contribuição antigênica em modelos de infecção (Höltje et al. 1975; Stapleton et al. 2007; Lorenz et al. 2011). Foram identificadas também algumas proteínas participantes da via glicolítica, tais como: triose-fosfato isomerase, enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e glicose-6-fosfato isomerase (Henderson and Martin, 2011).

As proteínas identificadas neste estudo foram anotadas de acordo com o banco de dados do UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant (<http://pedant.gsf.de/>), e foram categorizadas em 9 classes quanto à sua função biológica e percentual relacionado a sua abundância total no exoproteoma, respectivamente: Metabolismo (4%), Energia (14%), Ciclo celular e processamento de DNA (5%), Síntese proteica (9%), Regulação do metabolismo e função proteica (7%), Defesa celular e virulência (18%), Interação com o

Tabela 1. Lista de proteínas secretadas por *S. saprophyticus* identificadas por nano-ESI-UPLC-MS^E, classificadas quanto a sua função biológica⁷

Número de acesso ¹	Descrição	Cob. de sequência (%)	Predição de localização: LocateP ²	Secreção por via clássica: SignalP ³	Secreção por via não-clássica: SecretomeP ⁴	Correspondente em <i>S. aureus</i> ⁵	Peptídeo Sinal ⁶
Metabolismo							
SSP0684	Adenilato quinase	6.48	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1575	Pseudouridina sintase	23.61	Citoplasmática	Não	Sim	Sim	-
Energia							
SSP1693	Diidrolipoil desidrogenase	19.23	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1912	Enolase	38.48	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1813	Glicose-6-fosfato isomerase	31.38	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1916	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	34.63	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1914	Triose fosfato isomerase	40.71	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1001	L-lactato desidrogenase	15.72	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
Ciclo celular e processamento de DNA							
SSP1654	Proteína de divisão celular ZapA [#]	33.71	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1273	Proteína de ligação de DNA nucleóide HU	73.33	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
Síntese proteica							
SSP0667	30S proteína ribossomal S19	40.22	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP2373	30S proteína ribossomal S6	32.67	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1509	Fator de reciclagem ribossomal	33.15	Citoplasmática	Não	Sim	Sim	-
SSP2207	Fator de alongamento Tu	35.44	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
Regulação do metabolismo e função proteica							
SSP1738	Regulador transcricional	9.07	Membrana	Sim	Sim	66% de identidade	MNKFLKYFLIFLSLVLVVVPIIF AILLKSSQG**

SSP0646	Regulador transcricional da família MarR [#]	20.69	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP0954	Regulador transcricional [#]	35.09	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
Defesa celular e virulência							
SSP2255	50S proteína ribossomal L25	7.27	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP0656	Glicose-1-desidrogenase	36.5	Citoplasmática	Não	Não	38% de identidade	-
SSP2333	Alquil hidroperóxido redutase subunidade C	23.81	Citoplasmática	Não	Sim	Sim	-
SSP0848	Chaperonina GroEL	7.04	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP0503	Proteína de choque térmico	40.97	Citoplasmática	Não	Sim	43% de identidade	-
SSP1203	Superóxido dismutase [Mn/Fe] Proteína de estresse universal	42.21	Citoplasmática	Não	Sim	Sim	-
SSP1056	UspA e interação com nucleotídeos	17.96	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1089	Fator Trigger	16.74	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
Interação com o ambiente							
SSP0131	Antígeno imunodominante	14.46	Membrana	Sim	Sim	30% de identidade	MNQLVKVTLATGLALSAMVAT TSSMT**
SSP0613	Antígeno de secreção estafilocócico (Ssa)	23.65	Extracelular	Sim	Sim	63% de identidade	MKKIATATIATAGIATFAFAQH DADA**
SSP0609	Antígeno de secreção estafilocócico (Ssa)	10.32	Extracelular	Sim	Sim	65% de identidade	MKKLVTATTLTAGIGAAIVGLD HGNEADA**
SSP2136	Proteína hipotética contendo domínio de antígeno imunodominante B [#]	46.75	Membrana	Sim	Sim	Sim	MNKIAKTFVAGSIVFGTALGISV SNEGVSQTEA**
Biossíntese de componentes celulares							
SSP1741	Autolisina bifuncional (Aas)	46.62	Extracelular	Sim	Sim	42% de identidade	MAKKKNTYKVPSIVALTLAGT ALTTHHAQA**
SSP2001	Ácido lipoteicoico sintase	6.66	Membrana	Sim	Sim	Sim	MKLHKKKLTLEAFFILTVLTVT

							LKT**
SSP0293	Transglicosilase IsaA	41.98	Extracelular	Sim	Sim	49% de identidade	MKKTILASSLAVALGVGTGYAAT A*
SSP0117	Transglicosilase SceD 1	37.82	Membrana	Sim	Sim	56% de identidade	MKKTVVASTLAVGLGVGTGFAA GNSADA*
SSP0118	Transglicosilase SceD 2	33.73	Membrana	Sim	Sim	Sem identidade ^{\$}	MKKTVIASLAVGLGVGTGIAAG NSADA*
SSP0788	Transglicosilase SceD 3	37.82	Membrana	Sim	Sim	57% de identidade	MKKTVVASTLAVGLGVGTGFAA GNSADA*
SSP1961	Proteína hipotética contendo domínio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidase [#]	67.82	Extracelular	Sim	Sim	38% de identidade	MKKGLTFSITSALFFGMNHVA SA**
SSP0482	Transglicosilase [#]	42.62	Membrana	Sim	Sim	Sem identidade ^{\$}	MKKLLLASFASITIAATGYGVTS TADA**

Proteínas sem classificação

SSP2106	Proteína hipotética ^{###}	41.42	Extracelular	Sim	Sim	55% de identidade	MKKLFAAVIVSGLALSGMSTGS VDA*
SSP2326	Proteína hipotética ^{###}	26.81	Citoplasmática	Não	Sim	51% de identidade	-
SSP1478	Proteína hipotética ^{###}	42.25	Citoplasmática	Não	Não	Sim	-
SSP1699	Proteína hipotética ^{###}	11.11	Citoplasmática	Não	Sim	Sem identidade ^{\$}	-
SSP1566	Proteína hipotética ^{###}	65.57	Citoplasmática	Não	Sim	Sem identidade ^{\$}	-
SSP1109	Proteína hipotética ^{###}	26.92	Citoplasmática	Não	Sim	Sem identidade ^{\$}	-
SSP0913	Proteína hipotética ^{###}	100	Citoplasmática	Não	Não	52% de identidade	-

¹ Número de acesso fornecido pelo National Center of Biotechnology Information (NCBI. Web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG. Web site: <http://www.genome.jp/kegg/>).

² Predição de sub-localidade celular das proteínas secretadas por *S. saprophyticus* através da ferramenta de bioinformática LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>). Foi considerada uma faixa de -1 até 1, com um limiar de 0,5 para possibilidade de localização intracelular/citoplasmática, membrana ou extracelular/secretada com peptídeo sinal.

³ Predição para secreção por via clássica com peptídeo sinal através do algoritmo SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Foi considerado “predito”, todas aquelas proteínas com um ponto de corte de 0,57 para proteínas sem regiões transmembrana e 0,45 para proteínas com regiões transmembrana, sendo estes pontos de corte (“cutoff”) padrão para bactérias Gram-positivas.

⁴ Predição para secreção por via não-clássica utilizando o algoritmo SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Somente as proteínas secretadas com um score $\geq 0,5$ foram consideradas “preditas” como secreção por via não-clássica.

⁵ Busca no banco de dados de *S. aureus* de proteínas correspondentes em *S. saprophyticus*. Somente proteínas com identidade $\geq 70\%$ em *S. aureus* foram escolhidas como correspondentes. Aquelas que não tiveram correspondentes com nenhuma proteína de *S. aureus* foram denominadas como “Sem identidade” [5].

⁶ Predição do peptídeo sinal a partir do Uniprot [*] (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant [**] (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>).

⁷ Processos biológicos desempenhado por cada proteína listada. A anotação seguiu o critério de possibilidade da função desempenhada no meio extracelular, e o melhor E-value fornecido pelo banco de dados utilizado, que no caso foram UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>).

[#] Proteínas hipotéticas anotadas através da similaridade encontrada no bando de dados do grupo “estafilococos” no NCBI, utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

^{###} Proteínas hipotéticas sem similaridade com nenhuma proteína do grupo “estafilococos” de acordo com o BLAST.

ambiente (9%), Biossíntese de componentes celulares (18%) e Proteínas sem classificação (16%) (Figura 6). Apesar da diversidade funcional que estas proteínas podem exercer dentro do ambiente intracelular, outras funções são descritas para muitas proteínas quando estas se apresentam em ambiente extracelular. Sendo assim, várias das proteínas secretadas podem desempenhar diversos papéis para promover a patogênese no trato genito-urinário humano.

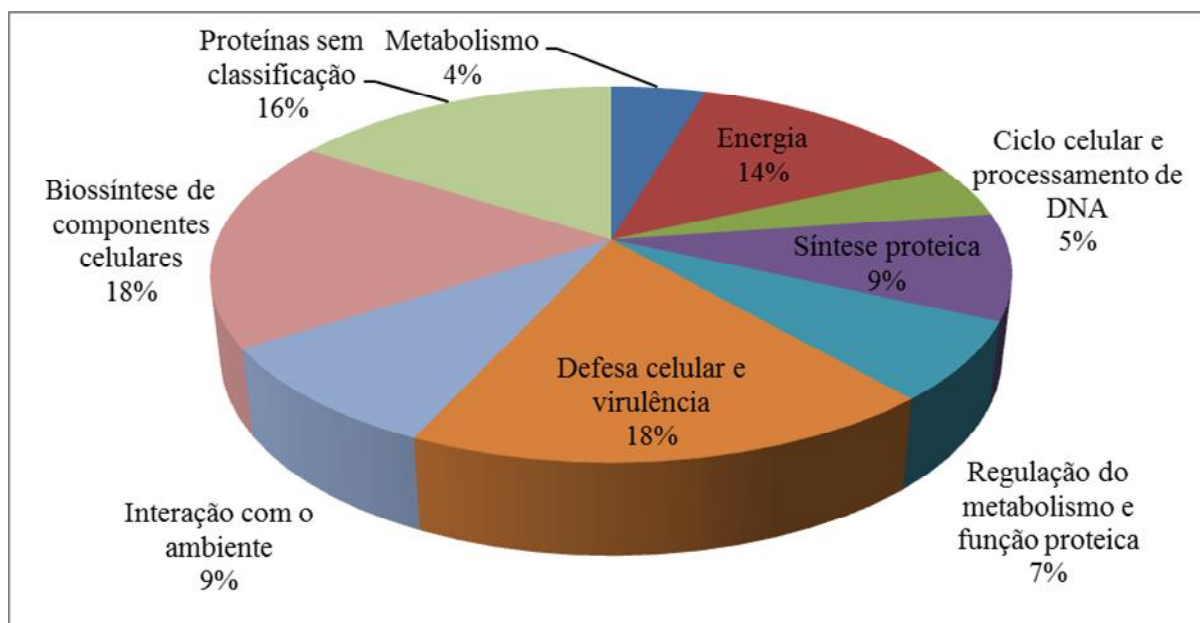


Figura 6. Disposição geral das funções exercidas pelas proteínas secretadas por *S. saprophyticus*. Abundância em %, das proteínas de acordo com sua função biológica anotada através do UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant (<http://pedant.gsf.de/>), das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*.

Enzimas relacionadas com o stress nitrosativo/oxidativo celular foram identificadas. Dentre elas estão a superóxido dismutase e a alquil hidroperóxido redutase subunidade C, que são proteínas cruciais durante o estresse oxidativo (Gaupp et al., 2012). Proteínas relacionadas com a síntese proteica se mostraram presentes, como a proteína ribossomal 50S, fator de alongamento Tu e duas proteínas ribossomais 30S (Visutthi et al., 2011). É importante ressaltar a presença de proteínas que possuem papel fundamental na divisão celular e organização da parede celular, como a autolisina bifuncional, que tem função essencial em remodelar o peptidoglicano em *Staphylococcus lugdunensis* (Bourgeois et al., 2009), no entanto, a autolisina bifuncional detectada neste estudo, é codificada pelo gene *Aas* de *S. saprophyticus*, se comporta como adesina, se ligando a fibronectina (Gatermann and Meyer, 1994) e com capacidade de hemaglutinação de eritrócitos (Meyer et al., 1996). Além disso, outra

enzima relacionada na síntese de ácido lipoteicoico, a ácido lipoteicóico sintase foi identificada, que por sua vez polimeriza 1,3-poliglicerol-fosfato a partir de fosfatidilglicerol, com auxílio de outras enzimas essenciais no processo de divisão celular, de bactérias Gram-positivas (Koch et al. 1984; Gründling & Schneewind 2007; Richter et al. 2013).

Essa heterogeneidade de proteínas secretadas por *S. saprophyticus*, reforça o pressuposto de que proteínas secretadas, mas que intracelularmente exercem funções metabólicas e na manutenção celular bacteriana, podem também participar na interação patógeno-hospedeiro durante a proliferação e contribuir para a patogênese. Essa diversidade de proteínas presentes no exoproteoma foi observada em diversos estudos envolvendo a bactéria patogênica *S. aureus*, o que reitera a suposição de que proteínas “moonlighting” podem participar de outros processos celulares.

5.3. Análise *in silico* do exoproteoma de *S. saprophyticus*

Já é sabido que proteínas envolvidas no metabolismo intracelular, podem se comportar como proteínas “moonlighting” fora da célula, podendo ser proteínas associadas à superfície da parede celular, ou mesmo exercendo função extracelular (Dreisbach et al. 2010; Henderson & Martin 2011). Dentre os achados deste trabalho, uma grande quantidade de proteínas que exercem funções metabólicas foi encontrada no secretoma. Dentre as 44 proteínas listadas, um total de 30 proteínas (68%), foram classificadas como sendo provenientes da região citoplasmática de *S. saprophyticus*, através do algoritmo LocateP (Figura 7). Além disso, um total de 8 proteínas (18%) foram preditas por serem ancoradas a membrana/parede celular e 6 proteínas (13%) foram preditas por constituírem a fração extracelular de *S. saprophyticus*, de acordo com este mesmo algoritmo (Figura 7).

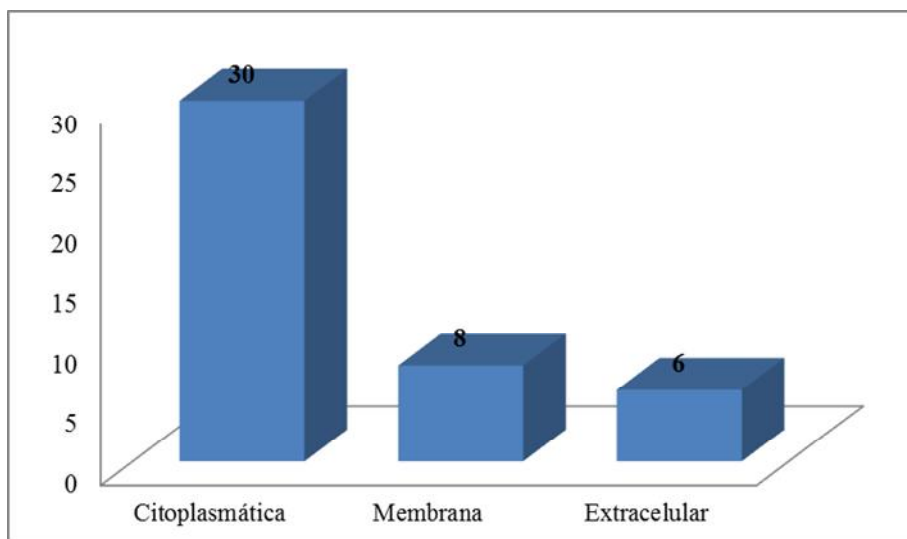


Figura 7. Sub-localidade celular. Número de proteínas previstas para sub-localidade celular das proteínas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus*, de acordo com a ferramenta de bioinformática LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>).

Justamente pelo fato de ter sido observado a pouca quantidade de proteínas com a possibilidade de serem secretadas, foi esperado que houvesse a quantidade equivalente de proteínas com peptídeo sinal. No entanto, foram previstas 14 proteínas (32%) que possuem peptídeo sinal, através do algoritmo SignalP, e portanto, são proteínas secretadas por via clássica, contra 23 proteínas (52%) que não possuem peptídeo sinal, que foram previstas através do algoritmo SecretomeP, e portanto, são proteínas secretadas por via não-clássica. Dentre as proteínas avaliadas para secreção por via clássica e não-clássica, um total de 14 proteínas em comum (SSP1741, SSP0131, SSP2001, SSP2106, SSP0613, SSP0609, SSP1738, SSP0293, SSP0117, SSP0118, SSP0788, SSP2136, SSP1961, SSP0482) tiveram predição para serem secretadas por via clássica (presença de peptídeo sinal N-terminal) e não-clássica (ausência de peptídeo sinal N-terminal), enquanto somente 9 proteínas apresentaram secreção por via não-clássica exclusivamente (SSP2333, SSP2326, SSP1699, SSP1566, SSP1109, SSP1509, SSP0503, SSP1203). Apesar da acurácia dos algoritmos utilizados, dentre as 44 proteínas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus*, um total de 21 proteínas não foram previstas para serem secretadas por via clássica e/ou não-clássica (Figura 8).

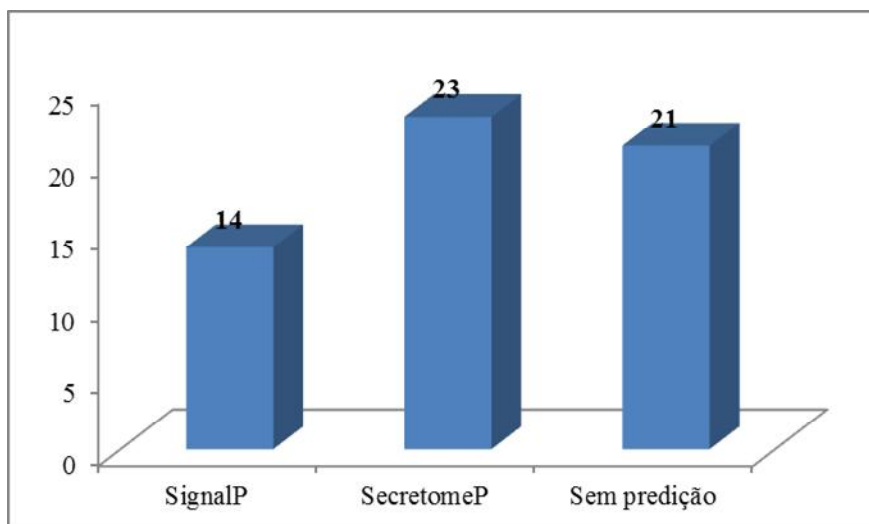


Figura 8. Predição de secreção Sec-dependente e independente. Número de proteínas preditas para serem secretadas por via clássica (SignalP) e por via não-clássica (SecretomeP). Um total de 21 proteínas não foram preditas para secreção por nenhum dos algoritmos utilizados.

Dentre as proteínas que foram observadas no secretoma de *S. saprophyticus*, foram encontradas um total de 13 proteínas hipotéticas, o equivalente a 30% do exoproteoma total. Esta classe de proteínas é abundantemente identificada em estudos proteômicos devido a pouca caracterização funcional das mesmas, e muitas das vezes não possuem um motivo ou domínio que permita identificação e/ou classificação. Muitas destas proteínas são identificadas em diversos estudos, realizando funções até então desconhecidas (Sibbald et al. 2006; Dreisbach et al. 2011; Monteiro et al. 2012). Análises de homologia utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram realizadas, permitindo a anotação da possível classificação funcional de 6 proteínas hipotéticas, sendo elas SSP1961, SSP0482, SSP2136, SSP0954, SSP0646 e SSP1654. A proteína SSP1961 apresentou 50% de identidade para acetilmuramoil-L-alanina amidase de *Staphylococcus pettenkoferii*, enquanto a SSP2136 apresentou 55% de identidade para antígeno imunodominante B em *Staphylococcus pasteurii*. As proteínas SSP0482, SSP0954, SSP0646 e SSP1654, tiveram identidades para: transglicosilase (75% de identidade com *Staphylococcus arlatae*), regulador transcricional (84% de identidade com *Staphylococcus lugdunensis*), regulador transcricional da família MarR (87% de identidade com *Staphylococcus equorum*) e para a proteína de divisão celular ZapA (95% de identidade com *Staphylococcus xylosus*), respectivamente. Das 13 proteínas hipotéticas detectadas no secretoma de *S. saprophyticus*, somente 7 não puderam ser anotadas (SSP0913, SSP2106, SSP2326, SSP1478, SSP1699, SSP1566 e SSP1109),

pois nenhuma delas apresentou nenhum domínio conservado conhecido, que correspondesse a qualquer proteína dentro do grupo “estafilococos”.

Devido ao fato de *S. aureus*, ser a espécie bacteriana com mecanismos de virulência e patogenicidade bem elucidados, além de possuir diversos estudos proteômicos visando à caracterização de proteínas de superfície e extracelulares (Dreisbach et al. 2010; Ravipaty & Reilly 2010; Dreisbach et al. 2011; Visutthi et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011), foi realizada outra busca no banco de dados do NCBI, com a finalidade de averiguar se as proteínas encontradas no exoproteoma de *S. saprophyticus*, poderiam ter correspondentes em *S. aureus*. No total, dentre as 44 proteínas identificadas, somente 25 delas tiveram correspondentes em *S. aureus*, tendo uma identidade $\geq 70\%$ e com E-value significativa. As 19 proteínas restantes, obtiveram uma identidade inferior ao ponto de corte estabelecido, no entanto, a porcentagem de identidade anotada está descrita na Tabela 1, não desprezando a relevância da conservação dessas proteínas. Apesar disso, 5 proteínas não obtiveram nenhuma identidade com *S. aureus*, sendo elas: SSP1699, SSP1566, SSP1109, SSP0118, SSP0482. Essa “exclusividade” de expressão, talvez se deva ao fato de que cerca de 582 ORFs de *S. saprophyticus*, ou cerca de 23,8% da quantidade das ORFs totais deste microrganismo, sejam exclusivas dessa espécie quando comparada com *S. aureus* e *S. epidermidis*, como descrito por Kuroda et al. (2005).

5.4. Imunização dos camundongos e identificação de proteínas imunogênicas

As imunizações foram realizadas conforme descrito na seção material e métodos do trabalho. Um total de 3 camundongos (n=3) foram utilizados para produzir anticorpos policlonais contra as proteínas presentes no exoproteoma de *S. saprophyticus*, e um camundongo (n=1), foi utilizado como pré-imune ou controle negativo. A Figura 9 ilustra os Western-blotting realizados com os soros dos camundongos sensibilizados durante o tempo de imunização, e evidencia uma reprodutibilidade das amostras e um controle negativo que não reagiu com extrato de proteínas secretadas por *S. saprophyticus*.

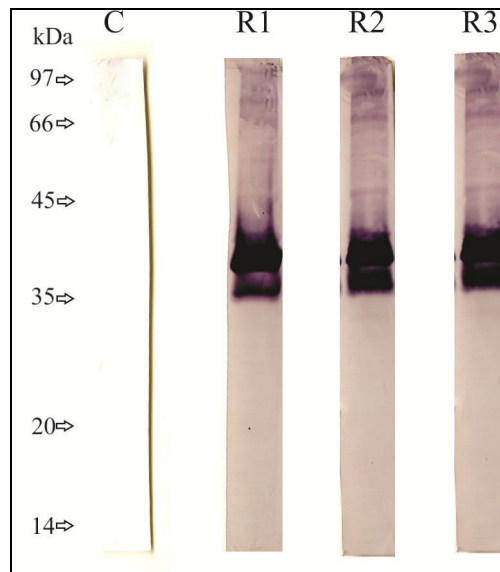


Figura 9. Imunização dos camundongos. Western-blotting realizado com os soros obtidos dos camundongos imunizados com o exoproteoma total de *S. saprophyticus*. À esquerda, é demonstrado o marcador de proteínas com peso molecular conhecido em kDa. Legenda: C, controle negativo; R1, replicata 1; R2, replicata 2; R3, replicata 3.

Foi realizada uma triplicata experimental de géis bidimensionais e de Western-blotting das proteínas secretadas por *S. saprophyticus*. Um total de 18 spots puderam ser detectados, através da sobreposição do Western-blotting no gel bidimensional. A Figura 10 mostra uma replicata do gel e do Western-blotting obtidos a partir do exoproteoma de *S. saprophyticus*. Para este estudo, foi utilizado o IPGstrip Immobiline não linear pH 4-7, pois como observado em outros estudos, a focalização isoeletrica de proteínas se mostra mais eficaz e nítida, do que o uso de strips em faixas maiores de pH, possibilitando a identificação de um maior número de proteínas (Muthukrishnan et al. 2011; Monteiro et al. 2012).

Foram identificadas um total de 5 proteínas com potencial imunogênico através de nano-ESI-UPLC-MS^E, sendo que três delas são isoformas de uma mesma proteína. O spots nº 1, 2, 4, 6 e 14, foram identificados por espectrometria de massas, e estão listadas na tabela 2. Os spots nº 2, 4 e 6, são isoformas para Ssa (*Staphylococcal secretion antigen*), que é uma proteína descrita em *S. aureus*, como proteína de secreção estafilocócica presente no exoproteoma de diversas linhagens desta espécie (Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Ravipaty & Reilly 2010; Visutthi et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011). Além disso, Ssa, também se apresentou com expressão diferenciada em estudo imunoproteômico utilizando soro de pacientes voluntários após 28 dias de colonização por *S. aureus*, onde os níveis de IgG se mostraram reativos para esta proteína (Holtfreter et al., 2009).

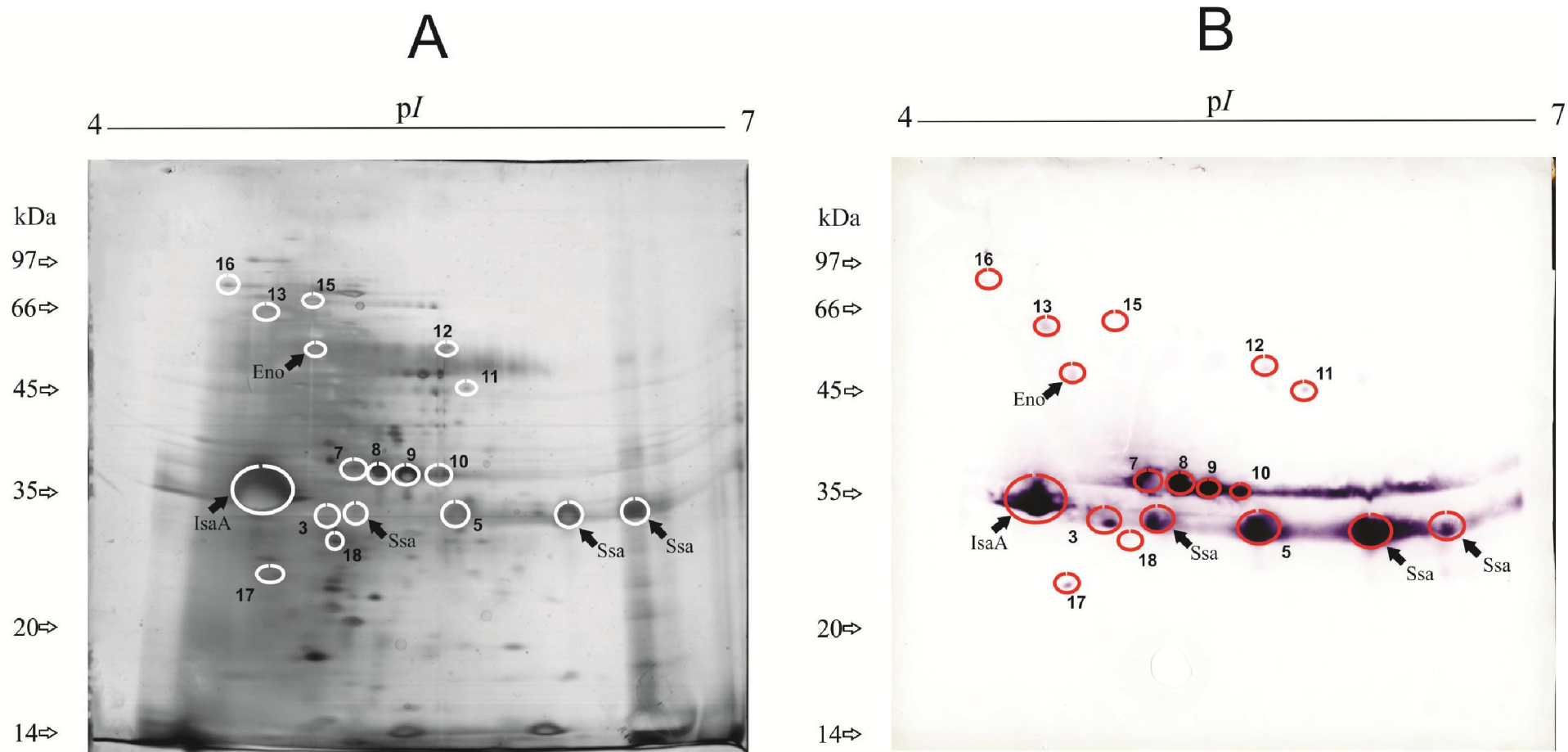


Figura 10. Perfil do 2-DE-PAGE e Western-blotting para análise imunoproteômica. (A) Gel bidimensional (2-DE-PAGE) contendo 500µg de proteínas secretadas e corados por prata, focalizados em IPGstrips Immobiline faixa de pH 4-7, utilizados para excisar os “spots” correspondentes no (B) Western-blotting de proteínas que reagiram com o soro de camundongo imunizado. As setas apontam as proteínas imunogênicas de *S. saprophyticus*, que foram identificadas por espectrometria de massas. Legenda: IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A* ou Transglicosilase IsaA); Ssa (*Staphylococcal secretion antigen*); Eno (Enolase). À esquerda, é demonstrado o marcador de proteínas com peso molecular conhecido em kDa.

Tabela 2. Lista de proteínas imunogênicas detectadas no exoproteoma de *S. saprophyticus* por Western-blotting e identificadas por nano-ESI-UPLC-MS^E

Nº do spot	Nº de acesso ¹	Descrição	Cob. De sequência (%)	pI teórico	Massa (Da)	Peptídeo sinal ²
1	SSP0293	Transglicosilase IsaA	16,5	4,6	25496	MAKKKNTYKVPSIVALTL AGTALTTHHAQA
2,4 e 6	SSP0613	Antígeno de secreção estafilocócico (Ssa)	5,8	5,8	24904	MKKIATATIATAGIATFAFA QHDADA
14	SSP1912	Enolase	12	4,4	47045	-

¹ Número de acesso fornecido pelo National Center of Biotechnology Information (NCBI. Web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG. Web site: <http://www.genome.jp/kegg/>).

² Predição do peptídeo sinal a partir do Pedant (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>).

O spot nº1 corresponde a proteína transglicosilase IsaA, que é uma hidrolase de peptideoglicano que também está presente no exoproteoma de diversos estudos envolvendo *S. aureus* (Sibbald et al. 2006; Ravipaty & Reilly 2010; Visutthi et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011), além de estar presente na superfície celular (Dreisbach et al 2010). IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A*), é descrito por apresentar outra função além de hidrolase de parede celular, devido ao fato de ter sido observada sua importância na relação patógeno-hospedeiro, se apresentando altamente imunogênica, constituindo-se um importante fator de virulência em *S. aureus* (Lorenz et al. 2000; Stapleton et al. 2007; Lorenz et al. 2011; Payne et al. 2013). É válido ressaltar, que estudos que abordaram a imunoproteômica como ferramenta para apontar possíveis fatores de virulência e/ou alvos potenciais para gerar uma vacina contra infecções causadas por *S. aureus*, IsaA, foi uma das proteínas que tiveram seus níveis de expressão diferenciados (Holtfreter et al., 2009). Os peptídeos gerados pela digestão trípica referente à IsaA, foram submetidos a cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas. A Figura 11 ilustra o cromatograma (A) e os espectros da IsaA (B) dos peptídeos analisados, que foram obtidos através do ProteinLynx Global Server.

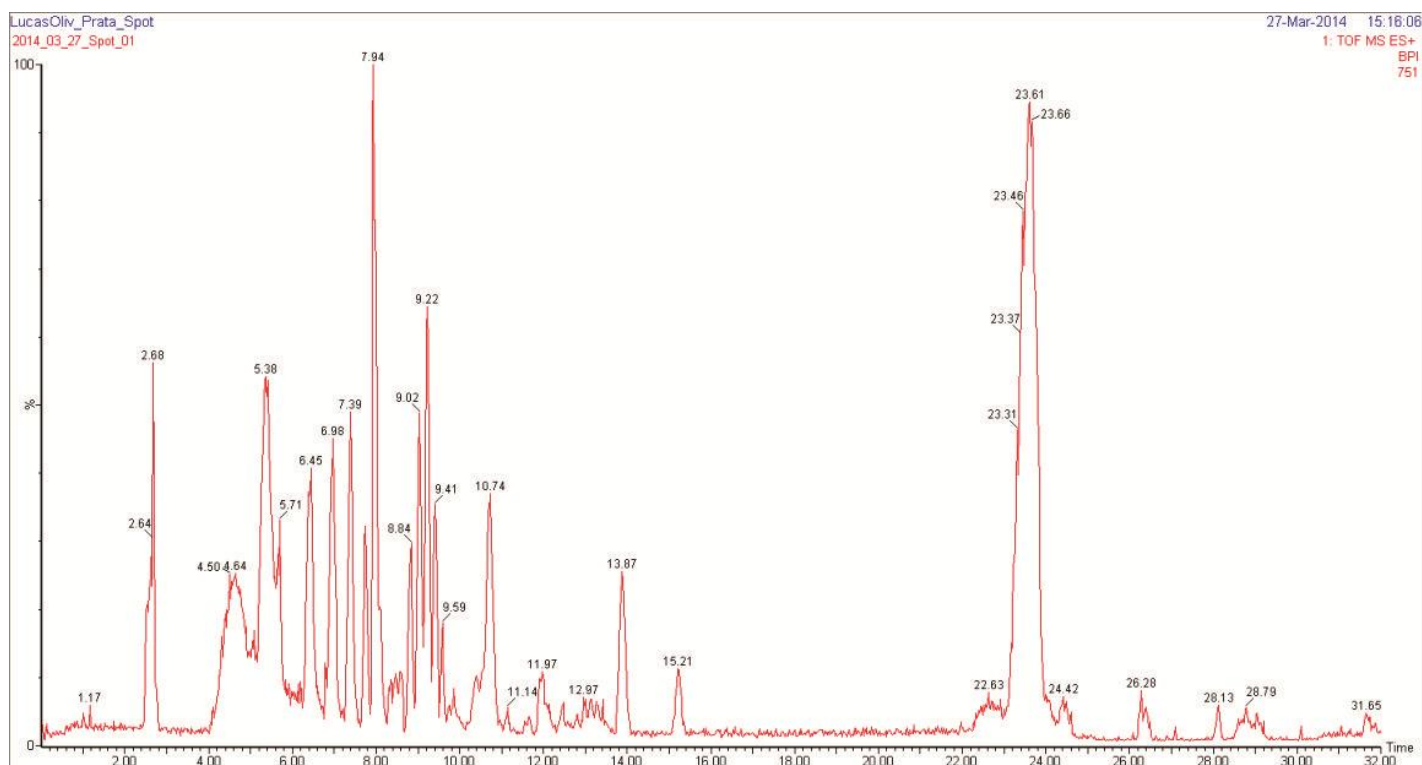
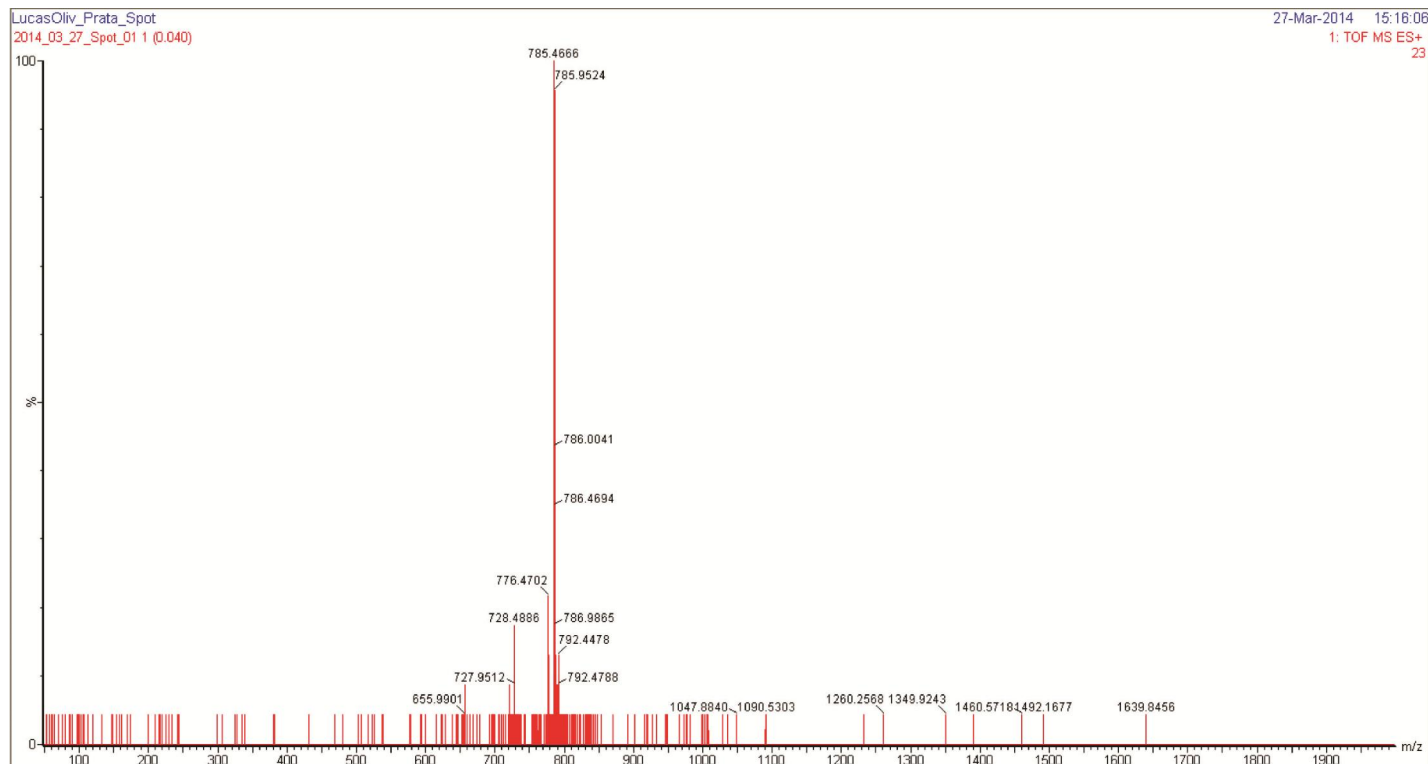
A**B**

Figura 11. Qualidade da digestão triptica da transglicosilase IsaA submetida a nano-ESI-UPLC-MS^E. (A) Cromatograma e (B) Espectro obtido dos peptídeos de IsaA. O cromatograma (A) evidencia uma boa ionização na fonte (ESI), possuindo peptídeos carregados com +1, +2, +3 e +4 cargas, enquanto que o espectro (B) ilustra um pico abundante de um peptídeo com massa de 785,4666 (m/z).

O spot nº14 corresponde à proteína enolase, que é uma das proteínas pertencentes à via glicolítica mais abundantes em *S. aureus* (Dreisbach et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011). Sua característica de se apresentar como proteína “moonlighting” tem sido observada (Henderson and Martin, 2011), além de demonstrar ser altamente imunogênica no exoproteoma de *S. aureus* (Burlak et al., 2007). Neste trabalho, as proteínas imunogênicas encontradas no exoproteoma de *S. saprophyticus*, corroboram com os estudos realizados com *S. aureus*, no que se restringe a sua antigenicidade e imunogenicidade frente a uma resposta imune humoral.

6 DISCUSSÃO

Vários estudos têm elucidado a possibilidade das proteínas de superfície e secretadas exercerem papéis centrais durante um processo infeccioso. Dentre as proteínas que foram apresentadas neste trabalho, algumas possuem característica de desenvolver papéis fundamentais no metabolismo da parede celular, remodelamento de peptídeoglicano, detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e algumas proteínas que exercem funções em vias metabólicas citoplasmáticas. Entretanto, estas últimas podem ser localizadas fora do citoplasma e participarem com funções totalmente diferentes em superfície celular e no exoproteoma/secretoma (Dreisbach et al. 2010; 2011; Muthukrishnan et al. 2011; Henderson & Martin 2011; Gaupp et al. 2012).

Duas classes de proteínas que se mostraram em abundância no exoproteoma de *S. saprophyticus*, foram a transglicosilase IsaA e transglicosilase SceD 1-3. As transglicosilases são classificadas como uma classe de autolisina, amplamente encontrada em bactérias Gram-negativas, no qual conseguem clivar ligações β -1,4 glicosídicas entre os ácidos N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico do peptídeoglicano, com formação de 1,6-ácido anidromurâmico, conforme descrito em *Escherichia coli* (Höltje et al., 1975). No entanto, além de possuir função catalítica também apresenta a característica de ser imunogênica em *S. aureus*, e por apresentar uma resposta imune com uma alta taxa de produção de imunoglobulina G em humanos, é um forte candidato a novas drogas/vacinas (Stapleton et al., 2007). É válido ressaltar, que em outros estudos realizados com *S. aureus*, a transglicosilase IsaA apareceu nas frações de superfície celular e extracelular (Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Dreisbach et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011), podendo desempenhar estes papéis biológicos também em *S. saprophyticus*.

Proteínas relacionadas com o estresse oxidativo e nitrosativo também foram encontradas, tais como a superóxido dismutase e a alquil hidroperóxido redutase subunidade C. A superóxido dismutase é uma metaloenzima que se liga a um co-fator para realizar a sua função de detoxificação de EROs. Neste trabalho, a superóxido dismutase ligante de ferro (Fe) e manganês (Mn) foi identificada. Esta enzima é capaz de converter o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou ainda evitar a formação de peroxinitrito ($OONO^-$) a partir de superóxido extracelular (Gaupp et al.,

2012). Esta enzima além de participar na detoxificação celular, também é conhecida como um fator de virulência, sendo codificada pelos genes *sodA* e *sodM* e essenciais na viabilidade e crescimento celular de *S. aureus* quando esta espécie se encontra em condições de estresse (Valderas and Hart, 2001). Vale ressaltar que *sodM* é exclusivo para *S. aureus*, e é ausente em estafilococos coagulase-negativos (Valderas et al., 2002), e apresenta fenótipo compensatório na ausência de *sodA* (Valderas and Hart, 2001). A superóxido dismutase também revelou ser essencial em manter o balanço redox no interior da célula e estresse oxidativo externo do fungo *Histoplasma* (Youseff et al., 2012). A enzima alquil-hidroperóxido redutase subunidade C, também identificada no exoproteoma de *S. saprophyticus*, realiza a detoxificação de alquil hidroperóxidos convertendo-os nos seus álcoois correspondentes utilizando NADH e NADPH como equivalentes redutores (Poole 2005; Gaupp et al. 2012). Em *Azospirillum brasiliense*, mutantes para alquil-hidroperoxidase redutase subunidade C (*ahpC*), resultou em um fenótipo pleiotrópico acometendo na alteração de propriedades da parede celular, aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e mobilidade prejudicada, sugerindo que esta enzima é essencial para a viabilidade celular de *A. brasiliense* (Wasim et al., 2009), no entanto, em *Salmonella typhimurium*, a falta de *ahpC*, refletiu na sensibilidade a RNI (*Reactive Nitrogen Intermediates*). Quando linhagens mutantes de *S. typhimurium* foram restituídas com *ahpC*, e adicionado o gene *ahpC* oriundo de *Mycobacterium tuberculosis*, a resistência a RNI foram complementadas, além daquela resistência apresentada somente por *S. typhimurium*. Esse fenótipo “mais resistente” a RNI promoveu uma maior resistência contra células humanas ao estresse nitrosativo, evitando a citotoxicidade e apoptose prematura (Chen et al., 1998).

Uma autolisina bifuncional também foi identificada no exoproteoma de *S. saprophyticus*, e como descrito em *S. lugdunensis*, o gene *AtlL* exerce dupla atividade de N-acetilmuramoi-L-alanina amidase e N-acetilglicosaminidase, que facilitam a remodelação do peptidoglicano e divisão celular (Bourgeois et al., 2009). Em *S. saprophyticus*, é o gene *Aas* que exerce este papel de autolisina bifuncional, como descrito por Kuroda et al. (2005) e Bourgeois et al. (2009), além de possuir também a característica de adesina, que se liga a fibronectina e possui atividade de hemaglutinação, como já descrito anteriormente (Hell et al., 1998). Em outro estudo realizado com *S. aureus*, foi observada a participação de *Atl* na formação de biofilme, além dos convencionais mecanismos relacionados com a autólise e divisão celular (Bose et al., 2012). Além disso, estudos envolvendo *S. epidermidis* e *S. aureus*,

apontaram que os genes *AtlE* e *Atl*, respectivamente, apresentaram um tropismo por componentes da matriz celular, tais como, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (Heilmann et al. 1997; Hirschhausen et al. 2010), além de apresentar uma virulência atenuada quando linhagens mutantes para *AtlE* e *Atl* de *S. epidermidis* e *S. aureus*, respectivamente, eram cultivadas na presença de células endoteliais EA.hy 926 (Hirschhausen et al., 2010).

Muitas proteínas que assumem papel na via glicolítica também foram identificadas no presente trabalho, tais como: glicose-6-fosfato isomerase (GPI), enolase (ENO), triose fosfato isomerase (TPI) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Estas proteínas, apesar de estarem participando intrinsecamente da glicólise e gliconeogênese, também apresentam a característica, já descrita em literatura, se comportando como proteínas “moonlighting” em vários microrganismos, ou seja, funções realizadas fora da função metabólica principal já descrita (Henderson and Martin, 2011). A glicose 6-fosfato isomerase, enolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foram descritas em *Lactobacillus crispatus* como sendo proteínas moonlighting de superfície, que aparentemente se mostraram com expressão dependente de pH, sendo secretadas na presença do peptídeo antimicrobiano LL-37, ou ainda exercendo papel de adesinas, com tropismo por laminina, fibronectina e colágeno I e IV (Kainulainen et al., 2012).

A enolase é uma das proteínas citoplasmáticas mais abundantes em procariotos, e ela tem sido observada em frações de superfície celular e extracelular de *S. aureus* (Burlak et al. 2007; Dreisbach et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011). Pelo fato de ser uma proteína abundante não só em *S. aureus*, a enolase foi caracterizada por ser uma proteína “moonlighting” em outros procariotos e eucariotos. Em *Lactobacillus plantarum*, a enolase se comportou como adesina auxiliando na ligação com a fibronectina humana (Castaldo et al., 2009). A enolase descrita em *Candida albicans*, detém a característica de ser altamente antigênica, e é lançada ao meio extracelular na presença do antibiótico papulacandina B (Eroles et al., 1997). Em estudo utilizando o soro de pacientes com febre reumática aguda estreptocócica, um elevado nível de enolase com reação cruzada com a enolase presente na superfície de neutrófilos humanos foi evidenciado, estando implicada na reação auto-imune de células do sistema imunológico (Fontán et al., 2000). Outro estudo abordando a enolase como proteína que possui alta antigenicidade, foi apontado por Kolberg et al. (2006), que *Streptococcus pneumoniae* possui uma alta afinidade por plasminogênio, sendo revelado que a enolase

estava presente nas frações citoplasmáticas e de membrana celular de *S. pneumoniae*.

Outra proteína com importante papel na via glicolítica, e que se comporta também como proteína moonlighting é a triose-fosfato isomerase, que já foi descrita na fração extracelular de *S. aureus* (Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Henderson & Martin 2011). Em um estudo com *S. aureus*, que buscou avaliar a ligação da triose-fosfato isomerase (TPI) com α -(1-3)-mano-oligossacarídeos oriundos da parede celular de *Cryptococcus neoformans*, observou-se que esta proteína se comporta como adesina nesta interação bactéria-fungo (Furuya and Ikeda, 2009). Em outro estudo envolvendo o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*, esta enzima também foi descrita por desempenhar um papel de adesina a fibronectina e com um tropismo preferencial por laminina. Além disso, a triose fosfato isomerase (TPI) de *P. brasiliensis* foi detectado na parede celular e que aparentemente teve interação com pneumócitos e células da linhagem Vero, reiterando a suposição da função de adesina deste fungo (Pereira et al., 2007).

Proteínas descritas participando na síntese proteica tem se demonstrado presentes na superfície de parede celular e exoproteoma de *S. aureus*. Algumas proteínas ribossomais tais como: 30S proteína ribossomal S19, 30S proteína ribossomal S6 e 50S proteína ribossomal L25, foram encontradas neste trabalho. Outros subtipos de proteínas ribossomais encontradas em superfície celular de *S. aureus*, tais como L11, L30 e L32 foram descritas por Dreisbach et al. (2010). As 50S proteínas ribossomais L1, L4, L18, L20, L22 e L24, foram observadas em estudo envolvendo *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA), e que possivelmente elas haviam sido responsivas durante o tratamento realizado com rodomicilona, e aparentemente secretadas por uma via não-clássica (Visutthi et al., 2011). Possivelmente, essa heterogeneidade de proteínas apresentada no exoproteoma de outros organismos, pode ser aplicada a *S. saprophyticus*, pois em *S. aureus*, essas exoproteínas podem estar relacionadas com estratégias de evasão do sistema imune. Ainda, em *B. subtilis*, o gene *ctc* codificante para a proteína ribossomal L25, se demonstrou responsiva ao estresse por choque térmico (Schmalisch et al., 2002).

Outra proteína encontrada, que está envolvida na síntese de proteínas, é o fator de alongamento Tu. Mais conhecida como EF-Tu, este possui a capacidade de ligar e transportar o aminoacil-tRNA para os ribossomos, utilizando energia de GTP/GDP, para sintetizar um novo polipeptídeo. Além de ter a função na síntese proteica, foi apontado o papel de chaperona desempenhado por EF-Tu, assistindo o

processamento e renaturação das proteínas citrato sintase e α -glicosidase de *E. coli*, além de proporcionar a proteção contra a desnaturação térmica dessas proteínas (Caldas et al., 1998). Ainda, foi abordado em um estudo que utilizou a abordagem da imunoproteômica com *Burkholderia pseudomallei*, mostrou que a EF-Tu está associada a membrana, e ainda pode ser secretada por vesículas. Neste mesmo estudo foi observada a capacidade imunogênica que esta proteína possui em induzir a formação de IgA e IgG em camundongos da linhagem BalbC, sendo proposta como um possível alvo para desenvolvimento de novas vacinas contra esta bactéria (Nieves et al., 2010).

Em *Clostridium difficile*, GroEL, uma chaperona geralmente encontrada na membrana celular e citoplasma, tem sido detectada no exoproteoma, sendo lançada no meio extracelular após estresse por choque térmico. Seu fenótipo de se comportar como adesina em células da linhagem Vero também foi avaliado, e foi observado que GroEL de *C. difficile* pode contribuir na adesão e internalização pelas células Vero, além de apresentar expressão aumentada após 1 hora de exposição com as células eucarióticas, sugerindo uma possível interação entre a bactéria e hospedeiro (Hennequin et al., 2001).

A chaperona fator Trigger também foi observada, e já foi identificada anteriormente em *S. aureus*. Esta proteína é uma das mais bem descritas em bactérias, pois é um tipo de chaperona que se associa com o ribossomo, e está diretamente ligada no processamento de cadeias de polipeptídeos nascentes (Henderson et al., 2006). Em *Streptococcus mutans*, o fator Trigger é fundamental durante o estresse oxidativo, e sua deficiência diminui a tolerância a agentes oxidativos, além de ter sido observado a contribuição deste gene na formação de biofilme, sendo que mutantes para o gene codificante *RopA* apresentaram uma incapacidade funcional em formar biofilme, o que sugere uma dificuldade de contato célula-célula e conseqüentemente sua adesão prejudicada (Wen et al., 2005).

Em um estudo envolvendo *E. coli*, foi observado que o fator Trigger está relacionado com o retardo da exportação de proteínas, tais como OmpA, OmpF e OmpC, além de possuir uma co-dependência de *secB* para conduzir essas proteínas para o meio extracelular. Quando o gene *tig*, codificante para o fator Trigger de *E. coli* é mutado, as proteínas observadas que são assistidas pelo fator Trigger, apresentam uma exportação acelerada, sugerindo que o fator Trigger de *E. coli* possui uma participação na secreção de proteínas, e a presença dela não bloqueia totalmente a exportação de proteínas, mas retarda o processo (Lee and Bernstein, 2002).

Podemos observar que proteínas extracelulares podem contribuir amplamente durante o processo de adesão, e conseqüentemente promover uma infecção de forma eficiente. Diversos fatores de virulência e proteínas imunogênicas podem ser encontrados no exoproteoma de diversos organismos e, portanto, estes se constituem interessantes alvos para novas terapias (Bröker and van Belkum, 2011). Uma das abordagens que tem sido empregada em diversos estudos para apontar possíveis proteínas-alvo com a finalidade terapêutica é a imunoproteômica. Em *S. aureus*, a imunoproteômica tem por base utilizar ferramentas de biologia molecular, tais como: SDS-PAGE e/ou 2-DE-PAGE acoplado com a técnica de Western-blotting, para averiguar possíveis proteínas que são reativas com soro de seres humanos (Clarke et al. 2006; Holtfreter et al. 2009) ou em camundongos contaminados (Burlak et al., 2007).

A bactéria patogênica *S. aureus*, têm sido um organismo promissor no que diz respeito ao uso da imunoproteômica para apontar novos fatores de virulência (Bröker and van Belkum, 2011) e também no desenvolvimento de novas terapias no combate as infecções estafilocócicas (Ohlsen and Lorenz, 2010). Um fator de virulência encontrado em *S. aureus*, que é secretado para o meio extracelular, e que possui uma participação decisiva durante o processo de adesão e infecção é a IsaA (Lorenz et al. 2000; Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Stapleton et al. 2007; Lorenz et al. 2011; Payne et al. 2013). Sua imunogenicidade tem sido observada em diversos estudos, que tiveram a abordagem da imunoproteômica, e que apresentaram níveis de ligação a IgG alterados, sugerindo um tropismo do sistema imune frente a este antígeno em *S. aureus* (Clarke et al. 2006; Holtfreter et al. 2009).

Este estudo constitui-se o primeiro de caráter proteômico, que buscou caracterizar o perfil de proteínas secretadas por *S. saprophyticus*, e em contrapartida, evidenciar proteínas com potencial imunogênico, que podem contribuir para a infecção o trato genito-urinário, através da imunoproteômica. Como apontado acima, IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A*), é um dos fatores de virulência em *S. aureus*, que tem sido amplamente observado em diversos estudos de cunho proteômico e imunoproteômico (Etz et al. 2002; Clarke et al. 2006; Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Holtfreter et al. 2009; Muthukrishnan et al. 2011). Através deste estudo, podemos sugerir que em *S. saprophyticus*, IsaA, também exerce papel imunogênico, e ainda pode ser um dos mais abundantes fatores de virulência desta bactéria uropatogênica, como pode-se notar na Figura 10, podendo contribuir de forma intrínseca durante a colonização da bexiga de mulheres e homens expostos a esta bactéria.

As proteínas Ssa (*Staphylococcal secretory antigen*) foi uma das proteínas identificadas neste estudo como imunogênicas (Ver Tabela 2 e Figura 10). Outros estudos envolvendo *S. aureus*, também apresentaram estas proteínas no seu exoproteoma e, portanto, também podem estar relacionadas com a interação patógeno-hospedeiro (Sibbald et al. 2006; Burlak et al. 2007; Ravipaty & Reilly 2010; Visutthi et al. 2011; Muthukrishnan et al. 2011). No imunoproteoma de *S. saprophyticus*, Ssa, se apresentou em três isoformas, que foram identificadas por espectrometria de massas. Seu papel no exoproteoma de *S. aureus* ainda é desconhecido, no entanto, é indiscutível a sua abundância e imunogenicidade no exoproteoma deste estudo e, portanto, pode ser um fator de virulência relevante para estudos posteriores envolvendo *S. saprophyticus*.

A enolase, que é uma das proteínas mais abundantes de *S. aureus* e outros microrganismos, também se apresentou imunogênica em *S. saprophyticus*. Burlak et al. (2007), realizou a caracterização do secretoma de uma cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), e em contrapartida, utilizou a abordagem da imunoproteômica para apontar novas proteínas imunogênicas relevantes para a patogênese de *S. aureus*, sendo que dentre os seus achados, a enolase foi uma das proteínas constituintes. Estudos de caráter imunoproteômico envolvendo *Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus anthracis*, respectivamente, revelaram a enolase como proteína imunogênica (Choi et al. 2012; Liu et al. 2013). Apesar de ser uma proteína imunogênica em diversos organismos, possivelmente, a enolase não constituiria um bom alvo para o desenvolvimento de vacinas ou terapias contra infecções estafilocócicas, devido ao fato da enolase ser também uma proteína abundante também nos hospedeiros, e isso poderia ser prejudicial para as células eucarióticas, pela inespecificidade que uma possível droga poderia agir. Uma estratégia para uma imunoterapia eficiente para uma nova droga ou tratamento deve possuir: (i) um alvo essencial na patogênese; (ii) um domínio de reconhecimento Fc dos anticorpos e (iii) pacientes aptos e uma população com uma diversidade genética ampla para os testes (Ohlsen and Lorenz, 2010).

7 CONCLUSÕES

Este estudo é o primeiro envolvendo *S. saprophyticus*, na ótica da proteômica e imunoproteômica das proteínas secretadas por esta bactéria uropatogênica. Muitas proteínas do exoproteoma de *S. saprophyticus* que foram encontradas neste estudo, possivelmente possuem papéis singulares extracelularmente, principalmente no que se restringe na sua interação patógeno-hospedeiro. Este trabalho identificou 44 proteínas inéditas de *S. saprophyticus* que são secretadas para o meio extracelular, além de revelar por Western-blotting, que 18 espécies proteicas presentes no exoproteoma de *S. saprophyticus*, possuem caráter imunogênico, o que constitui um importante achado, devido ao fato que pouco se conhece dessa bactéria em relação ao progresso da infecção e quais mecanismos de virulência são utilizados para o sucesso da patogênese. Somente 5 proteínas imunogênicas puderam ser identificadas pela metodologia empregada, sendo que 3 delas eram isoformas para Ssa (*Staphylococcal secretory antigen*), que é uma proteína encontrada em diversos estudos que buscaram elucidar o perfil do exoproteoma de *S. aureus*. A IsaA (*Immunodominant staphylococcal antigen A*), foi a proteína mais promissora deste trabalho, pois ela já foi caracterizada como um antígeno bem conhecido de *S. aureus*, o que pode abrir novas perspectivas para o estudo de *S. saprophyticus*, principalmente a sua contribuição durante a infecção do trato genito-urinário. A enolase também foi detectada neste estudo como sendo imunogênica, no entanto, novas terapias tendo esta proteína como alvo devem ser cuidadosamente avaliadas. Apesar de somente 5 proteínas terem sido identificadas, dentre as 18 proteínas apresentadas neste trabalho como imunogênicas, outros estudos de caráter imunoproteômico, tiveram um nível quantitativo de identificações similares (Nieves et al. 2010; Liu et al. 2013). Evidentemente, isso não diminui a importância da identificação das proteínas deste trabalho, pois possivelmente devido a sua abundância no imunoproteoma de *S. saprophyticus*, elas podem ser potenciais alvos para novas vacinas contra infecções urinárias estafilocócicas em um futuro próximo.

As proteínas já descritas anteriormente como “moonlighting”, já foram descritas em diversos organismos. No entanto, é prematuro afirmar com precisão se a função apresentada em outros estudos pode ser aplicada para as proteínas encontradas no exoproteoma de *S. saprophyticus*. Neste estudo, grande parte das proteínas secretadas por *S. saprophyticus* são citoplasmáticas (68%), tendo funções intracelulares

bem definidas. GAPDH, TPI, GPI e ENO, são exemplos de algumas proteínas que estão relacionadas com a glicólise e gliconeogênese, que foram identificadas no presente estudo. Assim podemos concluir que proteínas presentes no exoproteoma de *S. saprophyticus* também exercem função “moonlighting”, e podem estar vinculados com a virulência e adaptação da bactéria ao meio o qual ela se encontra. Grande parte das proteínas presente no exoproteoma de *S. saprophyticus*, foram preditas por serem secretadas por via não-clássica (52%) através do algoritmo SecretomeP. Além disso, 48% do exoproteoma de *S. saprophyticus*, não teve predição para ser secretada por via clássica através do algoritmo SignalP, nem por via não clássica, levando-nos a hipotetizar que muitas das proteínas detectadas são secretadas por alguma via até então desconhecida, sugerindo uma versatilidade de *S. saprophyticus* em conduzir proteínas que auxiliam no processo infeccioso para o meio extracelular. Possivelmente a secreção por vesículas seria a melhor explicação para encontrar tais proteínas no exoproteoma, no entanto, maiores estudos necessitam ser realizados para corroborar esta hipótese.

Como dito acima, este estudo caracteriza-se por ser o pioneiro tratando-se de *S. saprophyticus*, com uma abordagem proteômica e imunoproteômica. Muitas proteínas puderam ser identificadas por espectrometria de massas, o que levou a revelar o perfil do exoproteoma e detecção de proteínas imunogênicas de *S. saprophyticus*. Com isso, pode-se notar que o perfil de proteínas secretadas por *S. saprophyticus* é heterogêneo, possuindo proteínas com as mais diferentes funções intracelulares bem estabelecidas, mas que, no entanto, extracelularmente exercem função “moonlighting”. As proteínas imunogênicas identificadas, possivelmente podem participar da uropatôgenese, e estes achados podem levar a uma melhor compreensão do modo pelo qual *S. saprophyticus* coloniza a bexiga de mulheres e homens expostos a esta bactéria.

REFERÊNCIAS

- Anderson, M., Aly, K.A., Chen, Y.-H., Missiakas, D., 2013. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 Secretion System of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 90, 734–743.
- Baird-Parker, A.C., 1963. A Classification of Micrococci and Staphylococci Based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.* 30, 409–427.
- Beeckman, D.S.A., Vanrompay, D.C.G., 2010. Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Curr. Issues Mol. Biol.* 12, 17–42.
- Bendtsen, J.D., Kierner, L., Fausbøll, A., Brunak, S., 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5, 1–13.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Heijne, G. von, Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides — SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.
- Berthet, F.-X., Rasmussen, P.B., Rosenkrands, I., Andersen, P., Gicquel, B., 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144, 3195–3203.
- Bingle, L.E.H., Bailey, C.M., Pallen, M.J., 2008. Type VI secretion: a beginner's guide Lewis. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 3–8.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Müller, M., Sprenger, G.A., Freudl, R., 2005. Isolation and Characterization of Bifunctional *Escherichia coli* TatA Mutant Proteins That Allow Efficient Tat-dependent Protein Translocation in the Absence of TatB. *J. Biol. Chem.* 280, 3426–3432.
- Bolhuis, A., Matzen, A., Hyyryläinen, H.-L., Kontinen, V.P., Meima, R., Chapuis, J., Venema, G., Bron, S., Freudl, R., van Dijl, J.M., 1999. Signal Peptide Peptidase- and ClpP-like Proteins of *Bacillus subtilis* Required for Efficient Translocation and Processing of Secretory Proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 24585–24592.
- Bose, J.L., Lehman, M.K., Fey, P.D., Bayles, K.W., 2012. Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One* 7, 1–11.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Chapot-Chartier, M.-P., Pons, J.-L., Pestel-Caron, M., 2009. Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol Lett* 290, 105–113.

- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Braude, A.I., Siemienski, J., 1960. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. *J. Bacteriol.* 80, 171–179.
- Bröker, B.M., van Belkum, A., 2011. Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 11, 3221–3231.
- Burlak, C., Hammer, C.H., Robinson, M.-A., Whitney, A.R., McGavin, M.J., Kreiswirth, B.N., DeLeo, F.R., 2007. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. *Cell. Microbiol.* 9, 1172–1190.
- Burts, M.L., Williams, W.A., DeBord, K., Missiakas, D.M., 2005. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *PNAS* 102, 1169–1174.
- Caldas, T.D., Yaagoubi, A. El, Richarme, G., 1998. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* 273, 11478–11482.
- Cascales, E., 2008. The type VI secretion toolkit. *Eur. Mol. Biol. Organ.* 9, 735–741.
- Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R.A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., Sacco, M., 2009. Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Fact.* doi:10.1186/1475-2859-8-14
- Chen, L., Xie, Q., Nathan, C., 1998. Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol. Cell* 1, 795–805.
- Choi, C.-W., Lee, Y.G., Kwon, S.-O., Kim, H.-Y., Lee, J.C., Chung, Y.-H., Yun, C.-Y., Kim, S. Il, 2012. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* secreted antigens by immuno-proteomic approach. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 318–327.
- Cianciotto, N.P., 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581–588.
- Clarke, S.R., Brummell, K.J., Horsburgh, M.J., McDowell, P.W., Mohamad, S.A.S., Stapleton, M.R., Acevedo, J., Read, R.C., Day, N.P.J., Peacock, S.J., Mond, J.J., Kokai-Kun, J.F., Foster, S.J., 2006. Identification of In Vivo-Expressed Antigens of *Staphylococcus aureus* and Their Use in Vaccinations for Protection against Nasal Carriage. *J. Infect. Dis.* 193, 1098–1108.
- Cregg, K.M., Wilding, E.I., Black, M.T., 1996. Molecular Cloning and Expression of the spsB Gene Encoding an Essential Type I Signal Peptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 5712–5718.

- Daleke, M.H., Ummelsa, R., Bawonoc, P., Heringa, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Luirink, J., Bitter, W., 2012. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *PNAS* 109, 11342–11347.
- Delepelaire, P., 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 149–161.
- Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E., Pohlschröder, M., 2003. Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey. *J. Bacteriol.* 185, 1478–1483.
- Dreisbach, A., Hempel, K., Buist, G., Hecker, M., Becher, D., Dijn, J.M. van, 2010. Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 10, 3082–3096.
- Dreisbach, A., van Dijn, J.M., Buist, G., 2011. The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 11, 1–15.
- Eiff, C. von, Peters, G., Heilmann, C., 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* 2, 677–685.
- Eisner, G., Koch, H.-G., Beck, K., Brunner, J., Müller, M., 2003. Ligand crowding at a nascent signal sequence. *J. Cell Biol.* 163, 35–44.
- Erhardt, M., Namba, K., Hughes, K.T., 2010. Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 1–22.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R., 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* 143, 313–320.
- Etz, H., Minh, D.B., Henics, T., Dryla, A., Winkler, B., Triska, C., Boyd, A.P., Söllner, J., Schmidt, W., Ahsen, U. von, Buschle, M., Gill, S.R., Kolonay, J., Khalak, H., Fraser, C.M., Gabain, A. von, Nagy, E., Meinke, A., 2002. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 99, 6573–6578.
- Filloux, A., 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 163–179.
- Fontán, P.A., Pancholi, V., Nociari, M.M., Fischetti, V.A., 2000. Antibodies to Streptococcal Surface Enolase React with Human α -Enolase: Implications in Poststreptococcal Sequelae. *J. Infect. Dis.* 182, 1712–1721.
- Fronzes, R., Christie, P.J., Waksman, G., 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev.* 7, 703–714.
- Furuya, H., Ikeda, R., 2009. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and α -(1-3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 155, 2707–2713.

- Gatermann, S., John, J., Marre, R., 1989. *Staphylococcus saprophyticus* urease: Characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. *Infect. Immun.* 57, 110–116.
- Gatermann, S.G., Kreft, B., Marre, R., Wanner, G., 1992a. Identification and characterization of a Surface-associated protein Ssp of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* 60, 1055–1060.
- Gatermann, S.G., Marre, R., 1989. Cloning and Expression of *Staphylococcus saprophyticus* Urease Gene Sequences in *Staphylococcus carnosus* and Contribution of the Enzyme to Virulence. *Infect. Immun.* 57, 2998–3002.
- Gatermann, S.G., Meyer, H.-G.W., 1994. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect. Immun.* 62, 4556–4563.
- Gatermann, S.G., Meyer, H.-G.W., Wanner, G., 1992b. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin is a 160-Kilodalton surface polypeptide. *Infect. Immun.* 60, 4127–4132.
- Gaupp, R., Ledala, N., Somerville, G.A., 2012. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1–19.
- Geromanos, S.J., Vissers, J.P.C., Silva, J.C., Dorschel, C.A., Li, G.-Z., Gorenstein, M. V., Bateman, R.H., Langridge, J.I., 2009. 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.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601–605.
- Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E., Gebler, J.C., 2005. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J. Sep. Sci.* 28, 1694–1703.
- Gillespie, W.A., Sellin, M.A.G., Gill, P., Stephens, M., Tuckwell, L.A., Hilton, A.L., 1978. Urinary tract infection in young women, with special reference to *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Clin. Pathol.* 31, 348–350.
- Groicher, K.H., Firek, B.A., Fujimoto, D.F., Bayles, K.W., 2000. The *Staphylococcus aureus* lrgAB Operon Modulates Murein Hydrolase Activity and Penicillin Tolerance. *J. Bacteriol.* 182, 1794–1801.
- Gründling, A., Schneewind, O., 2007. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 104, 8478–8483.
- Gurung, M., Moon, D.C., Choi, C.W., Lee, J.H., Bae, Y.C., Kim, J., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, S. Il, Lee, J.C., 2011. *Staphylococcus aureus* Produces Membrane-Derived Vesicles That Induce Host Cell Death. *PLoS One* 6, 1–8.

- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., Götz, F., 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24, 1013–1024.
- Hell, W., Meyer, H.-G.W., Gatermann, S.G., 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol. Microbiol.* 29, 871–881.
- Henderson, B., Allan, E., Coates, A.R.M., 2006. Stress Wars: the Direct Role of Host and Bacterial Molecular Chaperones in Bacterial Infection. *Infect. Immun.* 74, 3693–3706.
- Henderson, B., Martin, A., 2011. Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious Disease. *Infect. Immun.* 79, 3476–3491.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D., 2004. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 692–744.
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Collignon, A., Barc, M.-C., Bourlioux, P., Karjalainen, T., 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 147, 87–96.
- Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C.T.N., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S., Ohta, T., 2008. Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* Isolates Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Have Emerged in Urogenital Tract Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2061–2068.
- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M.A., Götz, F., Peters, G., Heilmann, C., 2010. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell. Microbiol.* 12, 1746–1764.
- Holtfreter, S., Nguyen, T.T.H., Wertheim, H., Steil, L., Kusch, H., Truong, Q.P., Engelmann, S., Hecker, M., Völker, U., Belkum, A. van, Bröker, B.M., 2009. Human Immune Proteome in Experimental Colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1607–1614.
- Höltje, J.V., Mirelman, D., Sharon, N., Schwarz, U., 1975. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124, 1067–1076.
- Hovellius, B., Thelin, I., Mardh, P.-A., 1979. *Staphylococcus saprophyticus* in the aetiology of nongonococcal urethritis. *Br. J. Venereal Dis.* 55, 369–374.
- Kahlmeter, G., 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO·SENS Project. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 68–76.

- Kainulainen, V., Loimaranta, V., Pekkala, A., Edelman, S., Antikainen, J., Kylväjä, R., Laaksonen, M., Laakkonen, L., Finne, J., Korhonen, T.K., 2012. Glutamine Synthetase and Glucose-6-Phosphate Isomerase Are Adhesive Moonlighting Proteins of *Lactobacillus crispatus* Released by Epithelial Cathelicidin LL-37. *J. Bacteriol.* 2509–2519.
- Kilpatrick, L., Yan, X., Tchekhovskoi, D., Mirokhin, Y., S. Stein, 2012. Optimization of Tryptic Digestion Methods for LC- MS/MS Analysis of Chimeric Immunoglobulin G. *J. Biomol. Tech.* 23, 544.
- King, N.P., Beatson, S.A., Totsika, M., Ulett, G.C., Alm, R.A., Manning, P.A., Schembri, M.A., 2011. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. *Microbiology* 157, 1161–1175.
- King, N.P., Sakinç, T., Zakour, N.L. Ben, Totsika, M., Heras, B., Simerska, P., Shepherd, M., Gatermann, S.G., Beatson, S.A., Schembri, M.A., 2012. Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. *BMC Microbiol.* 12, 1–12.
- Kleine, B., Gatermann, S., Sakinç, T., 2010. Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. *BMC Res. Notes* 3.
- Kloos, W.E., Bannerman, Tammy, L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 117–140.
- Koch, H.U., Haas, R., Fischer, W., 1984. The role of lipoteichoic acid biosynthesis in membrane lipid metabolism of growing *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 138, 357–363.
- Kolberg, J., Aase, A., Bergmann, S., Herstad, T.K., Rødal, G., Frank, R., Rohde, M., Hammerschmidt, S., 2006. *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* 152, 1307–1317.
- Kuehn, M.J., Kesty, N.C., 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19, 2645–2655.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M., Ohta, T., 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *PNAS* 102, 13272–13277.
- Lee, H.C., Bernstein, H.D., 2002. Trigger Factor Retards Protein Export in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 43527–43535.
- Lee, J., Lee, E.-Y., Kim, S.-H., Kim, D.-K., Park, K.-S., Kim, K.P., Kim, Y.-K., Roh, T.-Y., Gho, Y.S., 2013. *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Carry Biologically Active B-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2589–2595.

- Li, G.-Z., Vissers, J.P.C., Silva, J.C., Golick, D., Marc V. Gorenstein, Geromanos, S.J., 2009. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* 9, 1696–1719.
- Liu, X., Wang, D., Ren, J., Tong, C., Feng, E., Wang, X., Zhu, L., Wang, H., 2013. Identification of the immunogenic spore and vegetative proteins of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R. *PLoS One* 8, 1–10.
- Lorenz, U., Lorenz, B., Schmitter, T., Streker, K., Erck, C., Wehland, J., Nickel, J., Zimmermann, B., Ohlsen, K., 2011. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 165–73. doi:10.1128/AAC.01144-10
- Lorenz, U., Ohlsen, K., Karch, H., Hecker, M., Thiede, A., Hacker, J., 2000. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 145–153.
- Luong, T.T., Ouyang, S., Bush, K., Lee, C.Y., 2002. Type 1 Capsule Genes of *Staphylococcus aureus* Are Carried in a Staphylococcal Cassette Chromosome Genetic Element. *J. Bacteriol.* 184, 3623–3629.
- Martins, L.M.S., Andrade, H.M. de, Vainstein, M.H., Wanke, B., Schrank, A., Balaguez, C.B., Santos, P.R. dos, Santi, L., Pires, S. da F., Silva, A.S. da, Castro, J.A.F. de, Brandão, R.M.S. de S., Monte, S.J.H. do, 2013. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. *Futur. Microbiol.* 8, 549–563.
- Matsuoka, E., Tanaka, Y., Kuroda, M., Shouji, Y., Ohta, T., Tanaka, I., Yao, M., 2011. Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A from *Staphylococcus saprophyticus* reveals participation of the B domain in ligand binding. *Protein Sci.* 20, 406–416.
- Meima, R., Eschevins, C., Fillinger, S., Bolhuis, A., Hamoen, L.W., Dorenbos, R., Quax, W.J., Dijn, J.M. van, Provvedi, R., Chen, I., Dubnau, D., Bron, S., 2002. The bdbDC Operon of *Bacillus subtilis* Encodes Thiol-disulfide Oxidoreductases Required for Competence Development. *J. Biol. Chem.* 277, 6994–7001.
- Meyer, H.-G.W., Wengler-Becker, U., Gattermann, S.G., 1996. The Hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* Is a Major Adhesin for Uroepithelial Cells. *Infect. Immun.* 64, 3893–3896.
- Mobley, H.L.T., Hausinger, R.P., 1989. Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. *Microbiol. Rev.* 53, 85–108.
- Monteiro, R., Vitorino, R., Domingues, P., Radhouani, H., Carvalho, C., Poeta, P., Torres, C., Igrejas, G., 2012. Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. *J. Proteomics* 2892–2915.

- Murad, A.M., Souza, G.H.M.F., Garcia, J.S., Rech, E.L., 2011. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). *J. Sep. Sci.* 34, 2618–30. doi:10.1002/jssc.201100238
- Muthukrishnan, G., Quinn, G.A., Lamers, R.P., Diaz, C., Cole, A.L., Chen, S., Alexander M. Cole, 2011. Exoproteome of *Staphylococcus aureus* Reveals Putative Determinants of Nasal Carriage. *J. Proteome Res.* 10, 2064–2078.
- Navaratna, M.A.D.B., Sahl, H.-G., Tagg, J.R., 1998. Two-Component Anti-*Staphylococcus aureus* Lantibiotic Activity Produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4803–4808.
- Nieves, W., Heang, J., Asakrah, S., Bentrup, K.H. zu, Roy, C.J., Morici, L.A., 2010. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One* 5, 1–12.
- Nijeholt, J.A.L. a, Driessen, A.J.M., 2012. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367, 1016–1028.
- Nouwen, N., Piwowarek, M., Berrelkamp, G., Driessen, A.J.M., 2005. The Large First Periplasmic Loop of SecD and SecF Plays an Important Role in SecDF Functioning. *J. Bacteriol.* 187, 5857–5860.
- O'Farrell, P., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Ohlsen, K., Lorenz, U., 2010. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 402–410.
- Pallen, M.J., 2002. The ESAT-6/WXG100 superfamily – and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol.* 10, 209–212.
- Parente, A.F.A., Bailão, A.M., Borges, C.L., Parente, J.A., Magalhães, A.D., Ricart, C.A.O., Soares, C.M. de A., 2011. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* 6, 1–14.
- Park, S., Kelley, K.A., Vinogradov, E., Solinga, R., Weidenmaier, C., Misawa, Y., Lee, J.C., 2010. Characterization of the Structure and Biological Functions of a Capsular Polysaccharide Produced by *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Bacteriol.* 192, 4618–4626.
- Payne, D.E., Martin, N.R., Parzych, K.R., Rickard, A.H., Underwood, A., Boles, B.R., 2013. Tannic Acid Inhibits *Staphylococcus aureus* Surface Colonization in an IsaA-Dependent Manner. *Infect. Immun.* 81, 496–504.
- Pereira, L.A., Bão, S.N., Barbosa, M.S., Silva, J.L.M. da, Felipe, M.S.S., Santana, J.M. de, Mendes-Giannini, M.J.S., Soares, C.M. de A., 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7, 1381–1388.

- Plessis, D.J.F. du, Nouwen, N., Driessen, A.J.M., 2011. The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* 851–865.
- Poole, L.B., 2005. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 240–254.
- Quiblier, C., Seidl, K., Roschitzki, B., 2013. Secretome Analysis Defines the Major Role of SecDF in *Staphylococcus aureus* Virulence. *PLoS One* 8.
- Ravipaty, S., Reilly, J.P., 2010. Comprehensive Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL Secretome by Two-dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1898–1919.
- Raz, R., Colodner, R., Kunin, C.M., 2005. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? *Clin. Infect. Dis.* 40, 896–898.
- Reed, P., Veiga, H., Jorge, A.M., Terrak, M., Pinho, M.G., 2011. Monofunctional Transglycosylases Are Not Essential for *Staphylococcus aureus* Cell Wall Synthesis. *J. Bacteriol.* 193, 2549–2556.
- Rezende, T.C.V. de, Borges, C.L., Magalhães, A.D., Sousa, M.V. de, Ricart, C.A.O., Bailão, A.M., Soares, C.M.A., 2011. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *J. Proteomics* 75, 572–587.
- Rice, K.C., Firek, B.A., Nelson, J.B., Yang, S.-J., Patton, T.G., Bayles, K.W., 2003. The *Staphylococcus aureus* cidAB Operon: Evaluation of Its Role in Regulation of Murein Hydrolase Activity and Penicillin Tolerance. *J. Bacteriol.* 185, 2635–2643.
- Richter, S.G., Derek Elli, Kim, H.K., Hendrickx, A.P.A., Sorg, J.A., Schneewind, O., Missiakas, D., 2013. Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-positive bacteria. *PNAS* 110, 3531–3536.
- Rosenstein, I.J., Hamilton-Miller, J.M., Brumfitt, W., 1981. Role of Urease in the Formation of Infection Stones: Comparison of Ureasases from Different Sources. *Infect. Immun.* 32, 32–37.
- Rupp, M.E., Han, J., Goering, R.V., 1995. Repeated recovery of *Staphylococcus saprophyticus* from the urogenital tracts of women: Persistence vs Recurrence. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2, 218–222.
- Rupp, M.E., Soper, D.E., Archer, G.L., 1992. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2975–2979.
- Sankaran, K., Wu, H.C., 1994. Lipid Modification of Bacterial Prolipoprotein. *J. Biol. Chem.* 269, 19701–19706.

- Sankinc, T., Kleine, B., Gatermann, S.G., 2006. SdrI, a Serine-Aspartate Repeat Protein Identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. *Infect. Immun.* 74, 4615–4623.
- Sankinc, T., Woznowski, M., Ebsen, M., Gatermann, S.G., 2005. The surface associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infect. Immun.* 73, 6419–6428.
- Santos, A.L. dos, Santos, D.O., Freitas, C.C. de F., Alves, B.L., Afonso, I.F., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab* 43, 413–423.
- Sarvas, M., Harwoodb, C.R., Bronc, S., Dijnl, J.M. van, 2004. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694.
- Schneider, P.F., Riley, T.V., 1992. Cell-surface hydrophobicity of *Staphylococcus saprophyticus*. *Epidemiol. Infect.* 106, 71–75.
- Schmalisch, M., Langbein, I., Stülke, J., 2002. The General Stress Protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a Ribosomal Protein. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 495–501.
- Shaw, C., Stitt, J.M., Cowan, S.T., 1951. *Staphylococci and their Classification*. *J. Gen. Microbiol.* 5, 1010–1023.
- Sibbald, M.J.J.B., Ziebandt, a K., Engelmann, S., Hecker, M., de Jong, A., Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., Stokroos, I., Arends, J.P., Dubois, J.Y.F., van Dijnl, J.M., 2006. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 755–88. doi:10.1128/MMBR.00008-06
- Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P., Andersen, A.B., 1995. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1710–1717.
- Stapleton, M.R., HorsburghE, M.J., Hayhurst, E.J., Wright, L., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., Foster, S.J., 2007. Characterization of IsaA and SceD, Two Putative Lytic Transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 7316–7325.
- Teti, G., Chiofalo, M.S., Tomasello, F., Fava, C., Mastroeni, P., 1987. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* adherence to uroepithelial cells by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* 55, 839–842.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y.F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M., Dijnl, J.M. van, 2004. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 207–233.

- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D.H., Bron, S., van Dijl, J.M., 2000. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 515–547.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., Setubal, J.C., 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9 Suppl., 1–9.
- Valderas, M.W., Gatson, J.W., Wreyford, N., Hart, M.E., 2002. The Superoxide Dismutase Gene *sodM* Is Unique to *Staphylococcus aureus*: Absence of *sodM* in Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Bacteriol.* 184, 2465–2472.
- Valderas, M.W., Hart, M.E., 2001. Identification and Characterization of a Second Superoxide Dismutase Gene (*sodM*) from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 3399–3407.
- Veenendaal, A.K.J., Does, C. van der, Driessen, A.J.M., 2004. The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 81–95.
- Vickers, A.A., Chopra, I., O'Neill, A.J., 2007. Intrinsic Novobiocin Resistance in *Staphylococcus saprophyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4484–4485.
- Visutthi, M., Srimanote, P., Voravuthikunchai, S.P., 2011. Responses in the Expression of Extracellular Proteins in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Treated with Rhodomycinone. *J. Microbiol.* 49, 956–964.
- Vrontou, E., Economou, A., 2004. Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 67–80.
- Wasim, M., Bible, A.N., Xie, Z., Alexandre, G., 2009. Alkyl hydroperoxide reductase has a role in oxidative stress resistance and in modulating changes in cell-surface properties in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* 155, 1192–1202.
- Wen, Z.T., Suntharaligham, P., Cvitkovitch, D.G., Burne, R.A., 2005. Trigger Factor in *Streptococcus mutans* Is Involved in Stress Tolerance, Competence Development, and Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 73, 219–225.
- Widerström, M., Wiström, J., Ferry, S., Karlsson, C., Monsen, T., 2007. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* Isolated from Women with Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1561–1564.
- Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A., Monsen, T., 2012. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 7–20.
- Yen, M.-R., Tseng, Y.-H., Nguyen, E.H., Wu, L.-F., Jr., M.H.S., 2002. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* 177, 441–450.

- Youseff, B.H., Holbrook, E.D., Smolnycki, K. a, Rappleye, C.A., 2012. Extracellular Superoxide Dismutase Protects *Histoplasma* Yeast Cells from Host-Derived Oxidative Stress. PLoS Pathog. 8, 1–17. doi:10.1371/journal.ppat.1002713
- Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J., 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Quim. Nova 21, 787–793.
- Zhou, M., Boekhorst, J., Francke, C., Siezen, R.J., 2008. LocateP: Genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. BMC Bioinformatics 9, 1–17.

ANEXO (Manuscrito submetido na *Microbes and Infection*)

Manuscript Number:

Title: Characterization of the exoproteome from *Staphylococcus saprophyticus* reveals immunogenic proteins and predicted virulence factors

Article Type: Original article

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*, exoproteome, immunoproteomic, putative virulence factors

Corresponding Author: Dr. Juliana Alves Parente-Rocha, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Goiás

First Author: Lucas S Oliveira, Msc

Order of Authors: Lucas S Oliveira, Msc; Alex J Carvalho, Msc; Andrea S Oliveira, Graduated; AnaFlávia A Parente, Ph.D.; Alexandre M Bailão, Ph.D.; Clayton L Borges, Ph.D.; Célia Maria A Soares, Ph.D.; Marcia Giambiagi-deMarval, Ph.D.; Juliana Alves Parente-Rocha, Ph.D.

Abstract: *Staphylococcus saprophyticus* is a gram positive, coagulase-negative bacterium encountered in the human microbiome that can be uropathogenic especially affecting young women. Despite the characterization of a large number of secreted and cell surface proteins from *Staphylococcus aureus*, only a few proteins have been characterized in *S. saprophyticus*. The present work aims to identify secreted proteins (exoproteome) from *S. saprophyticus*. Additionally, we generated polyclonal antibodies against the exoproteome to identify secreted immunogenic proteins of this bacteria. A total of 44 proteins were identified in the exoproteome including 25 possible virulence factors such as heat shock proteins, transglycosylases and proteins related to oxidative stress. Moreover, we listed moonlighting proteins in the exoproteome, such as enolase, triosephosphate isomerase, glucose-6-phosphate isomerase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The immunogenic proteins identified by the immunoproteomic analysis were transglycosylase IsaA, enolase and staphylococcal secretion antigen. This work describes the proteins secreted by *S. saprophyticus* for the first time, including three immunogenic secreted proteins. The data obtained in this study contribute to elucidating the protein repertoire used by *S. saprophyticus* to infect the human urinary tract.

Suggested Reviewers: Charley Staats PhD
Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
staats@cbiot.ufrgs.br

Simone S Weber Ph.D.
Professor, Universidade Federal de Manaus
swbiotecnologia@yahoo.com.br

Opposed Reviewers:



To
Microbes and Infection Editorial board

Goiania, October 1st, 2015.

It is our pleasure to submit our article entitled “**Characterization of the exoproteome from *Staphylococcus saprophyticus* reveals immunogenic proteins and predicted virulence factors**” to the Microbes and Infection editorial board.

In this manuscript, we described the identification of 44 secreted proteins of *S. saprophyticus* by using nano-electrospray coupled to mass spectrometry analysis. Also, we obtained polyclonal antibodies in mice against the total exoproteome and, by using 2D-SDS PAGE gels, we identified 18 protein spots reacting against the polyclonal antibodies. We identified a total of 5 protein spots corresponding to 3 proteins from *S. saprophyticus*. These immunogenic proteins were previously described in other *Staphylococcus* species as immunogenic proteins, corroborating our data. Also, we performed *in silico* analysis to identify *S. saprophyticus* proteins that can act as virulence factor by comparing our data with experimental data obtained in other pathogens.

This article is part of our work on identification and characterization of molecules associated to the pathogen-host interaction. We believe that this article represents a great contribution for those involved in this area.

We hope to hear from you soon.

Sincerely,

Juliana Alves Parente-Rocha, PhD
Laboratório de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás,
74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.
Tel/Fax:55-62-35211110
e-mail: <juparente@gmail.com >

1 **Characterization of the exoproteome from *Staphylococcus saprophyticus* reveals**
2 **immunogenic proteins and predicted virulence factors**

3

4 **Lucas Silva de Oliveira¹, Alex Jesus de Carvalho¹, Andréa Santana de Oliveira¹,**
5 **Ana Flávia Alves Parente², Alexandre Melo Bailão¹, Clayton Luiz Borges¹, Célia**
6 **Maria de Almeida Soares¹, Marcia Giambiagi-deMarval³, Juliana Alves Parente-**
7 **Rocha^{1*}.**

8 ¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
9 Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

10 ² Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Manaus, Manaus,
11 Amazonas, Brazil.

12 ³ Laboratório de Microbiologia Molecular – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de
13 Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ.

14 * Corresponding author. Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de
15 Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
16 Federal de Goiás, Goiânia, 74690-900, Goiás, Brazil. Phone/Fax: +55 62 3521 1110.

17 *E-mail addresses*

18 LSO: lucas-biologo@hotmail.com

19 AJC: alexjcarvalho@gmail.com

20 ASO: andrea.biomed@live.com

21 AFAP: afparente@yahoo.com.br

22 AMB: alexandre.bailao@gmail.com

23 CLB: clbluiz2@gmail.com

24 CMAS: cmasoares@gmail.com

25 MGM: marciagm@micro.ufrj.br

26 JAPR: juparente@gmail.com

27

28 **ABSTRACT**

29 *Staphylococcus saprophyticus* is a gram positive, coagulase-negative bacterium
30 encountered in the human microbiome that can be uropathogenic especially affecting
31 young women. Despite the characterization of a large number of secreted and cell
32 surface proteins from *Staphylococcus aureus*, only a few proteins have been
33 characterized in *S. saprophyticus*. The present work aims to identify secreted proteins
34 (exoproteome) from *S. saprophyticus*. Additionally, we generated polyclonal antibodies
35 against the exoproteome to identify secreted immunogenic proteins of this bacteria. A
36 total of 44 proteins were identified in the exoproteome including 25 possible virulence
37 factors such as heat shock proteins, transglycosylases and proteins related to oxidative
38 stress. Moreover, we listed moonlighting proteins in the exoproteome, such as enolase,
39 triosephosphate isomerase, glucose-6-phosphate isomerase and glyceraldehyde 3-
40 phosphate dehydrogenase. The immunogenic proteins identified by the
41 immunoproteomic analysis were transglycosylase IsaA, enolase and staphylococcal
42 secretion antigen. This work describes the proteins secreted by *S. saprophyticus* for the
43 first time, including three immunogenic secreted proteins. The data obtained in this
44 study contribute to elucidating the protein repertoire used by *S. saprophyticus* to infect
45 the human urinary tract.

46 **Key-words:** *Staphylococcus saprophyticus*, exoproteome, immunoproteomic, putative
47 virulence factors.

48

49 **1. Introduction**

50 *Staphylococcus saprophyticus* is a gram positive bacterium that causes urinary tract
51 infections (UTIs) in healthy young women [1]. This species is responsible for
52 approximately 40% of UTIs in young women [2]. Some virulence factors are
53 characterized in *S. saprophyticus*, such as urease [3, 1], which converts urea into
54 ammonia and increases the pH in the bladder; the adhesin Ssp [4]; the Aas that has
55 hemagglutinin activity against sheep erythrocytes [5] and possess binding-protein
56 properties to fibronectin [6]; the anchored to the cell wall protein with a LPxTG motif,
57 named SdrI (Serine-Aspartate Repeat Protein I), that is an adhesin with a large tropism
58 to collagen [7], and the uroadherene factors UafA (uroadherence factor A) and UafB
59 (uroadherence factor B) that are described facilitating adhesion and invasion to
60 uroepithelial cells (UafA) and bind to fibronectin and fibrinogen (UafB), [8, 9].

61 Many proteomic studies using *Staphylococcus aureus* exoproteome have been
62 performed to elucidate the roles of secreted proteins, which could act during the
63 infection process [11, 14] and several secreted virulence factors have been described,
64 such as β -lactamase, coagulase, catalase, enterotoxins, clumping factors A and B, IsdA
65 (iron-surface determinant A), SasD (cell wall surface anchor family protein), SdrH
66 (serine-aspartate repeat family protein), Srt (sortase), SPA (Staphylococcal Protein A),
67 EbpS (surface elastin binding protein), PBPs (penicillin binding protein), Csp (cold
68 shock protein), IsaA (immunodominant staphylococcal antigen A), and SOD
69 (superoxide dismutase) and hemolins [11, 16].

70 The mechanism of protein secretion is complex, and several secretion pathways are
71 known in bacteria, such *Staphylococcus aureus* [14]. Two major pathways of
72 protein/peptide secretion are known as signal peptide dependent and signal peptide
73 independent systems. The signal peptide dependent systems, also called “classic
74 pathway” can be subdivided into the Sec translocation system, representing the major
75 secretion system, and the twin-arginine translocation system (Tat) [13]. Proteins that are
76 targeted for secretion by the “classic pathway” generally possess a signal peptide at the
77 N- terminal end [14]. These proteins are assisted by specific chaperones in the Sec-
78 dependent pathway, which is composed by SecA-ATPase, SecYEG and SecDF (YajC)
79 proteins with sites recognized by signal peptidases (SPases), which has the major role of
80 split out this signal sequence [19]. Despite its biological role being poorly understood,
81 the SecDF function is related to SecA and SecYEG, and it was observed that SecDF
82 deletion can impair the regulatory process [17], affecting the profile of secreted proteins
83 [18].

84 The second most common pathway secretion in bacteria is called Tat (twin-arginine
85 translocation). Tat translocases consist of two or three membrane integrated subunits of
86 TatABC proteins, forming together a receptor and protein conducting machinery for Tat
87 substrates, while some evidences has been shown that some proteins could be
88 transported by both Sec- or Tat-pathways, regarding the requirement of folding
89 properties of substrates, due to the fact that Sec-substrates are generally unfolded, in
90 contrast to folded proteins exported through Tat-pathway [19].

91 Other secretion pathways are well known in many gram positive and gram negative
92 pathogens, with most of them related to pathogenesis process. There are seven known
93 secretory systems in bacteria named as “Type Secretion System (TSS)”, and each one
94 secretes particular toxins and other important proteins for the pathogen [20]. These

95 pathways secrete proteins without a requirement of a signal peptide at N-terminal end,
96 and are known as non-classical pathways. [21] This way of secretion was firstly
97 described in *Mycobacterium tuberculosis* and named Type VII Secretion System
98 (T7SS). Proteins secreted by this pathway present a signal sequence at C-terminal end
99 known as YxxxD/E and are exported by proteins that could act as translocon [22, 23].
100 Probably, the only way of protein secretion that does not require signal peptide is
101 through vesicles. *S. aureus* secretes vesicles containing virulence factors, such as
102 protein A and β -lactamase that play role in virulence and antibiotic resistance [24].
103 In this work, we describe for the first time, the exoproteome of *S. saprophyticus*. By a
104 proteomic approach, it was possible to identify 44 secreted proteins. Polyclonal
105 antibodies were obtained against the total exoproteome, and a total of 18 protein species
106 reacted with the polyclonal antibodies as shown by immunoblotting analysis. Of 18
107 protein spots, 3 were identified as the same protein, a secretory antigen described in
108 several lineages of *Staphylococcus aureus* species. The other immunogenic proteins
109 identified were transglycosylase A (IsaA) and enolase. These proteins can be associated
110 with an immunogenic response in the host because they can incite an immune response.
111 Mass spectrometric identification in conjunction with an immunoproteomic approach
112 contributes to the identification of putative virulence factors and proteins related to host-
113 pathogen interactions.

114 **2. Material and methods**

115 **2.1. Ethics Statement**

116 This study was submitted under an ethics statement at the “Comitê de Ética em Pesquisa
117 (CoEP)” from the “Universidade Federal de Goiás” and approved under protocol
118 N°047/13. The animal experiments were conducted in accordance with legislation for
119 the protection of animals used for scientific purposes (EU Directive 2010/63).

120 **2.2. *S. saprophyticus* strain maintenance and culture conditions**

121 *Staphylococcus saprophyticus* strain ATCC 15305 isolated from infected human urine
122 was used in this work. *S. saprophyticus* cells were cultivated in BHI (Sigma-Aldrich, St.
123 Louis, MO, USA) and stored at -80°C in 50% glycerol. In order to evaluate the protein
124 secretion by *S. saprophyticus* obtain the secretome, a single *S. saprophyticus* colony
125 was pre-incubated in BHI medium in Erlenmeyer flasks for 18 h at 100 g, 36°C. After
126 this period, the *S. saprophyticus* cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 10

127 min, washed with PBS and transferred to fresh BHI medium for 1, 3 and 6h at 100 g
128 and 36°C. The supernatant was collected after this period of incubation.

129 **2.3. Obtainment, precipitation and quantification of secreted proteins by**
130 ***S. saprophyticus***

131 After cell growth, the cells were centrifuged at 4000 g for 10 min, and the supernatant
132 obtained was filtered through 0.45- μ m and 0.22- μ m filters (Millipore®, Bedford, MA,
133 USA). Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a final
134 concentration of 10% was added to the supernatant, and precipitation was performed for
135 16 h at 4°C [18]. A protein pellet was obtained by centrifugation of the supernatant for 1
136 h at 5000 g and 4°C. The pellet was washed 3 times with cold acetone (Sigma-Aldrich,
137 St. Louis, MO, USA) and concentrated with 50 mM ammonium bicarbonate buffer
138 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 8.5, in a 3-kDa disposable Amicon ultrafilter
139 (Millipore®, Bedford, MA, USA). For PCR reactions the supernatant was concentrated
140 50-fold by using Vivispin 3-kDa filter (GE Healthcare, Bjorkgatan, Uppsala, Sweden)
141 to avoid interference of TCA and acetone in the PCR reaction. After concentration, the
142 sample was quantified in a spectrophotometer at 595 nm using the Bradford method for
143 protein determination with BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to construct a
144 standard curve NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

145 **2.4. Analysis of culture supernatant by polymerase chain reaction (PCR)**

146 The PCR analysis of the culture supernatant was performed using genomic DNA as
147 control. The genomic DNA was extracted after cell lysis in Bead Beater equipment
148 (Biospec, Bartlesville, OK, USA) with 0.1-0.5 glass beads (Sigma-Aldrich, St. Louis,
149 MO, USA) using a standard method [25]. The PCR reaction was performed with 2 μ L
150 of concentrated culture supernatant or genomic DNA and oligonucleotides to amplify a
151 189-bp fragment of the *rpsa* gene encoding the 30S ribosomal protein S1. The
152 oligonucleotides used were 30S sense: 5' GTCGTAAAGCAGTAGAGGCATT 3' and
153 30S antisense: 5' AAACGTGAACAAGTCCATCAAC 3'. The reaction was performed
154 as follows: 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds and 72°C for 30
155 seconds. The PCR amplicons were visualized in a 1% agarose gel stained with Gel Red
156 (Biotium, Hayward, CA, USA). The PCR sensitivity was evaluated using genomic
157 DNA as a template at concentrations of 50 ng to 1 pg.

158

159 **2.5. Trypsin digestion of the total exoproteome and nano-ESI-UPLC-**
160 **MS^E analyses**

161 A total of 200 µg of the exoproteome suspended in 50 mM ammonium bicarbonate
162 buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 8.5, was used for tryptic digestion.
163 Afterwards, the samples were treated with RapiGEST SF Surfactant (Waters
164 Corporation, Manchester, UK) (0.2% v/v) and incubated in a dry bath at 80°C for 15
165 min. The samples were treated with 100 mM dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare,
166 Bjorkgatan, Uppsala, Sweden) at 60°C for 30 min and 300 mM iodacetamide (GE
167 Healthcare, Bjorkgatan, Uppsala, Sweden) at room temperature for 30 min. Trypsin
168 (Promega, Madison, WI, USA) was added to digest the samples at 37°C in a dry bath
169 for 16 h. Then, a 5% TFA solution was added to the samples and incubated for 90 min
170 at 37°C. The supernatants were dried in a speed vacuum (Eppendorf, Hauppauge, NY,
171 USA). All peptides obtained in the pellet were suspended in Milli-Q water, desalted and
172 concentrated using ZipTips C18 Pipette Tips (Millipore, Bedford, MA, USA) as
173 previously described and dried on a speed vacuum. The peptides were suspended in 200
174 µL of a solution containing 20 mM ammonium formate and 200 fmol MassPREPTM
175 Phosphorylase B Standard (Waters Corporation, Manchester, UK). Protein
176 identification was performed by a nanoscale LC separation of tryptic peptides using the
177 nanoACQUITYTM system (Waters Corporation, Manchester, UK) equipped with a
178 Symmetry C18 5 µm, 180 µm X 20 mm precolumn and an XBridge C18 5 µm, 200 µm
179 X 50 mm column and a 1.7 µm, 100 µm X 100 mm analytical reversed-phase column
180 (Waters Corporation, Manchester, UK). The resulting MS/MS spectra were processed
181 using Masslynx 4.0 software (WatersMicromass, Manchester, UK).

182 **2.6. Data processing and protein identification**

183 The MS data obtained via UPLC-MS^E were processed and examined using the
184 ProteinLynx Global Server (PLGS) version 2.4 (Waters Corporation, Manchester, UK).
185 For protein identification and quantification level analysis, the observed intensity
186 measurements were normalized with the identified peptides from the digested internal
187 standard, as previously described [26].

188
189
190

191 **2.7. Prediction of protein localization, function and secretion pathway**
192 **involvement by *in silico* analysis**

193 The prediction of localization of the identified proteins was performed using LocateP
194 (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>), SignalP
195 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and SecretomeP
196 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) algorithms to predict protein secretion by
197 the classical or nonclassical secretion pathway. Categorization of protein function was
198 performed using the UniProt (<http://www.uniprot.org/>), MIPS (<http://pedant.gsf.de/>),
199 NCBI/BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and KEGG
200 (<http://www.genome.jp/kegg/>) algorithms.

201 **2.8. Generation of polyclonal antibodies**

202 Polyclonal antibodies were obtained through total exoproteome inoculation in Balb/c
203 mice to obtain polyclonal antibodies against the immunogenic proteins secreted by *S.*
204 *saprophyticus*. A total of three immunizations were performed over an interval of 15
205 days. We used 500 µg of the total exoproteome for each inoculation. The first
206 immunization was performed with an equal volume of complete Freund's adjuvant
207 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the others were performed with equal
208 volumes of incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The
209 experiment was performed in triplicate, and pre-immune serum from each animal was
210 obtained and stored at -20°C in 50% glycerol.

211 **2.9. 2-DE-PAGE and western blotting analysis**

212 A total of 500 µg of the exoproteome from *S. saprophyticus* was precipitated using the
213 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare, Bjorkgatan, Uppsala, Sweden). The sample
214 preparation and 2D electrophoresis were performed as described [26]. The first
215 dimension was performed using Immobiline nonlinear DryStrips pH 4-7 (GE
216 Healthcare, Bjorkgatan, Uppsala, Sweden) with the following program: 30 V for 14 h;
217 500 V for 1 h; 1000 V for 1 h; 2000 V over 3 h; 8000 V for 8 h; and 300 V for 12 h. The
218 protein extracts resolved by 2-DE-PAGE were transferred to nylon membranes, blocked
219 with 5% (w/v) nonfat milk and incubated with the polyclonal antibodies (diluted
220 1:2000) for 2 h, followed by incubation with alkaline phosphatase secondary anti-mouse
221 IgG (diluted 1:5000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h. Negative controls
222 were obtained with mouse pre-immune serum (diluted 1:2000). The membranes were

223 developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate and nitroblue tetrazolium
224 (BCIP/NBT) (GE Healthcare, Bjorkgatan, Uppsala, Sweden). The 2-DE-PAGE gels and
225 the western blotting were performed in triplicate.

226 **2.10. In gel digestion of immunogenic protein spots**

227 The spots that reacted with polyclonal antibodies against the *S. saprophyticus*
228 exoproteome were manually excised from the 2-DE-PAGE gel and incubated in 50 mM
229 sodium thiosulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 15 mM potassium
230 ferricyanide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 min and washed twice with
231 water. The in-gel digestion was performed manually as previously described [27].
232 Briefly, the spots were dehydrated with acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
233 USA) dried in a speed vacuum, reduced with 10 mM DTT (GE Healthcare, Bjorkgatan,
234 Uppsala, Sweden) and alkylated with 55 mM iodoacetamide (GE Healthcare,
235 Bjorkgatan, Uppsala, Sweden). The gels were washed with 25 mM ammonium
236 bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dehydrated twice in 25 mM
237 ammonium bicarbonate containing 50% (v/v) acetonitrile. Afterwards, the gel pieces
238 were dried and digested using trypsin (Promega, Madison, WI, USA) for 16 h at 37°C.
239 The supernatant was treated with 50% (v/v) acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
240 USA) containing 5% (v/v) TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The samples
241 were dried in a speed vacuum, and the peptides were solubilized in water and desalted
242 using the ZipTips C18 Pipette Tips (Millipore, Bedford, MA, USA). The identification
243 of the protein spots was performed using a nanoscale LC separation of tryptic peptides
244 in the nanoACQUITY™ system (Waters Corporation, Manchester, UK), as described
245 above.

246 **3. Results**

247 **3.1. Validation of the exoproteome obtainment**

248 In order to choice a time point that showed protein secretion without cell lysis we
249 performed secreted protein obtainment and PCR assay, as previously described, after 1,
250 3 and 6 hours of incubation of *S. saprophyticus* in BHI medium. The sensitivity of the
251 PCR assay was evaluated using primers to amplify a 189-bp fragment of the *rpsa* gene.
252 The smallest quantity of DNA that was amplified by PCR was 50 pg (Fig. 1, Panel A,
253 lane 3), which showed that the technique was able to amplify the *rpsa* gene fragment
254 with only 50 pg DNA present in the cell-free supernatant. Fig. 1, Panel B, lanes 1 and 2
255 shows that the *rpsa* gene fragment was not detected in the *S. saprophyticus* cell-free

256 supernatants, which reinforces the hypothesis that cell lysis did not occur during the *S.*
257 *saprophyticus* incubation for until 3 hours in BHI medium. However, after 6 hours of
258 incubation the PCR amplify the *rpsa* gene fragment showing cell lysis was significant at
259 this point (Fig. 1, Panel B, lane 3). The Fig 1, Panel C shows *S. saprophyticus* secretes
260 proteins after 1, 3 and 6 hours of incubation in BHI medium (lanes 1, 2 and 3,
261 respectively). Therefore, for proteomic experiments we used the time of incubation of 3
262 hours since *S. saprophyticus* is able to secrete proteins without cell lysis.

263 **3.2. Identification of proteins in *S. saprophyticus* exoproteome**

264 The secretory proteins from *S. saprophyticus* were obtained, trypsin digested and
265 identified using nano-ESI-UPLC-MS^E analyses, as previously described. Table 1
266 presents the list of identified proteins in the *S. saprophyticus* exoproteome. A total of 44
267 proteins were identified in the exoproteome of *S. saprophyticus* and categorized by
268 functional analysis. It is important to note that proteins involved in oxidative stress were
269 found in the exoproteome, suggesting that *S. saprophyticus* has an effective cellular
270 defense mechanism against reactive oxygen species (ROS).

271 **3.3. Prediction of biological function of proteins found in the** 272 **exoproteome from *S. saprophyticus***

273 All proteins listed in Table 1 were classified by their biological functions and plotted in
274 Fig. 2. The categories represented within the exoproteome of *S. saprophyticus* were
275 metabolism, energy, cell cycle and DNA processing, transcription, protein synthesis,
276 protein fate, protein with binding function, cellular transport, cell rescue, defense and
277 virulence, biogenesis of cellular components, regulation of metabolism and protein
278 interaction with the environment, subcellular location and unclassified proteins. The
279 functional classes most abundant in the *S. saprophyticus* exoproteome were cell rescue,
280 defense and virulence; and biogenesis of cellular components, representing 18% each
281 (Fig. 2). The secreted proteins from *S. saprophyticus* suggest that many proteins
282 involved in different biological processes may participate in the exoproteome to
283 facilitate infection and protect *S. saprophyticus* from external stress, as demonstrated in
284 previous studies in *S. aureus* [12, 28, 29, 30, 31].

285
286
287

288 **3.4. Prediction of the localization of identified proteins from the *S.***
289 ***saprophyticus* exoproteome**

290 The prediction of localization of the proteins identified in the exoproteome from *S.*
291 *saprophyticus* was performed as previously described using the algorithms listed above.
292 A total of 14 proteins identified in the exoproteome were predicted to be secreted by
293 classical or non-classical pathways, and 8 were predicted to be secreted only by a non-
294 classical pathway. A total of 22 proteins have no known signal peptide for secretion,
295 leading to a cytoplasmic prediction. However, several cytoplasmic secreted proteins
296 have been described that can act as extracellular moonlighting proteins in bacteria [32]
297 and fungi [26]. The prediction for protein localization is shown in Table 1.

298 **3.5. Immunogenic proteins identified from the *S. saprophyticus***
299 **exoproteome**

300 The Balb/c mouse immunizations were performed as previously described, and the
301 secreted immunogenic proteins were identified. Fig. 3, Panel A depicts a western blot
302 performed with polyclonal antibodies against the total exoproteome using sera obtained
303 from 3 animals and a pre-immune serum that was used as a negative control. No
304 reaction was observed for the pre-immune serum (Fig. 3, Panel A, Lane 1). Western
305 blotting with sera from 3 animals shows the reproducibility of the immunological
306 response against the exoproteome from *S. saprophyticus* (Fig. 3, Panel A, Lanes 2-4).
307 Afterwards, we performed a 2-D SDS-PAGE gel to visualize the exoproteome profile
308 from *S. saprophyticus* (Fig. 3, Panel B). 2-D Western blotting revealed 18 protein spots
309 reacting against the polyclonal antibodies (Fig. 3, Panel C). The corresponding spots on
310 the 2-DE-PAGE gel were manually excised and identified by mass spectrometry. The
311 spots were digested with trypsin as previously mentioned; 5 spots were identified and
312 are listed in Table 02. The most abundant protein spot in the exoproteome of *S.*
313 *saprophyticus* (spot one in Fig. 3, Panels B and C) was identified as the
314 transglycosylase protein IsaA. The other 3 spots (spots 02, 04 and 06 in Fig. 3, Panels B
315 and C) were identified as isoforms from the putative secretory antigen from *S.*
316 *saprophyticus*, and spot 14 (marked in Fig. 3, Panels B and C) was identified as enolase
317 from *S. saprophyticus*. The other protein spots were not identified, most likely because
318 of the low protein concentration or because of post-translational modifications that can
319 cause difficulty with the trypsin cleavage.
320

321 **3.6. Predicted virulence factors in the exoproteome of *S. saprophyticus***

322 Extracellular proteins develop “moonlighting” functions that could provide a better
323 interaction between the host and pathogen. Many of these proteins are characterized as
324 virulence factors and have been observed participating as a vehicle to ensure efficient
325 pathogenesis [32]. In this study, we identified 44 novel proteins in the exoproteome of
326 *S. saprophyticus*. Among them, 25 proteins are described as virulence factors in other
327 pathogens. These proteins are shown in Table 3. Some of these proteins were
328 characterized in *S. aureus* as virulence factors, such as transglycosylase IsaA
329 (immunodominant staphylococcal antigen A), SceD 1-3 transglycosylases and secretory
330 antigen precursor (SsaA). Many ‘moonlighting’ proteins found in this study were
331 crucial in the adhesion of *Streptococcus* spp. on extracellular matrix components, such
332 as plasminogen and laminin [33, 34].

333 Other proteins with well-established intracellular functions were observed as virulence
334 factors in bacteria such as *Yersinia pestis*, *Streptococcus mutans* and *Leptospira* sp. [35,
335 36, 37]. The proteins identified by immunoproteomic approach in this study
336 (transglycosylase IsaA, enolase and secretory antigen precursor) are also described as
337 virulence factors in other pathogens [29, 34, 38] and further analysis are required to
338 prove the importance of these proteins for immunogenicity and pathogenicity in *S.*
339 *saprophyticus*.

340

341 **4. Discussion**

342 This current study describes the proteomic profile of the exoproteome from *S.*
343 *saprophyticus* for the first time. Additionally, we identified immunogenic proteins from
344 the *S. saprophyticus* exoproteome. It was possible to identify 44 proteins in the
345 exoproteome of *S. saprophyticus*, and it is likely that some of these extracellular
346 proteins may have a role as virulence factors outside of bacterial cells. Several studies
347 have been performed to characterize the exoproteome in bacterial models. Among
348 proteins involved in metabolic processes, proteins that function in the glycolytic
349 pathway were identified, such as enolase, glucose-6-phosphate isomerase,
350 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and triose phosphate isomerase. These
351 proteins have been found in various studies on the *S. aureus* exoproteome [16, 12].
352 These proteins can play different roles extracellularly as “moonlighting proteins”.
353 Enolase is related to plasminogen binding in several streptococcal species such as *S.*

354 *pneumoniae* [54]. GAPDH is also encountered on the cell surface and outside the cell in
355 several bacterial species, including *S. pneumoniae* [33]

356 Proteins involved in cell defense and virulence were also identified in the *S.*
357 *saprophyticus* exoproteome, such as superoxide dismutase and alkyl hydroperoxide
358 reductase subunit C. These proteins have been described in other studies involving
359 exoproteomes [30]. In *S. aureus*, the oxidative stress caused by H₂O₂ increases the
360 expression of transcripts encoding these proteins, and the ability to respond to oxidative
361 stress can enhance bacterial virulence because mutants lacking these proteins are less
362 virulent [55].

363 Some transglycosylases were identified in this study. Of special note, the
364 immunodominant staphylococcal antigen A (IsaA) was identified. In *S. aureus* IsaA
365 plays a role during infection and biofilm formation in the presence of tannic acid [31] or
366 even in neutrophil infection [29]. IsaA has been detected in *S. aureus* exoproteome
367 studies [10, 12, 55]. Another transglycosylase detected in the exoproteome from *S.*
368 *saprohyticus* was SceD. This protein is required for virulence in *S. aureus*, acting in an
369 independent manner as a form of IsaA, which could compensate for the loss of IsaA,
370 and playing a crucial role in nasal colonization [28].

371 The analysis of the proteins identified in the *S. saprophyticus* exoproteome shows that
372 25 of the 44 proteins are described as virulence factors in other pathogens. For example,
373 proteins involved in peptidoglycan modification that are classically encountered in the
374 cell wall but have been described in the *S. aureus* exoproteome [10] were observed as
375 virulence factors in *S. aureus* and other bacterial species [42, 51], including *S.*
376 *saprophyticus* itself [6]. Further studies need to be performed to clarify the role of these
377 putative virulence factors and the relevance of ‘moonlighting proteins’ on the survival
378 of *S. saprophyticus* during infection of a host.

379 Interestingly, all 3 immunogenic proteins secreted by *S. saprophyticus* identified in this
380 study were predicted to be virulence factors (Table 3) and 2 of them (IsaA –
381 immunodominant staphylococcal antigen A and Ssa – secretory antigen precursor) are
382 virulence factors described in *S. aureus*, but their molecular functions remain poorly
383 understood [28, 29, 31]. Nevertheless, structural and functional analysis is required to
384 better understand the role of these proteins in the virulence of *S. saprophyticus*.

385 It is important to note that previous studies in *S. aureus* (including 25 clinical isolates)
386 identified a high heterogeneity in the exoproteome profiles. Only 63 secreted proteins
387 were identified in all isolates [57]. Also, the comparative exoproteomics of *S. aureus*

388 infecting skin/soft tissue infections, bacteremia, and subclinical colonization shows a
389 completely different exoproteome profile among the isolates, suggesting the
390 exoproteome profile depends of external factors, such as nutrient availability and niche
391 of infection [11].

392 There are no data concerning the *S. saprophyticus* exoproteome, and further analysis
393 including other clinical isolates will contribute to the identification of proteins secreted
394 by a large number of isolates. We detected 18 protein spots that reacted with antibodies,
395 and we identified 5 protein spots corresponding to 3 *S. saprophyticus* proteins: enolase,
396 IsaA and staphylococcal secretory antigen. Further analyses are required to understand
397 the role of these proteins during *S. saprophyticus* infection of a human host. However,
398 this is an important study that can contribute identifying target proteins secreted by *S.*
399 *saprophyticus*. Additionally, exoproteome analysis is an important tool to identify
400 proteins involved in host-pathogen interactions and can contribute to the elucidation of
401 strategies used by *S. saprophyticus* to succeed during infection.

402

403 **Acknowledgements**

404 This work was financial supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento
405 Científico e Tecnológico (CNPq) 478184/2010-7. LSO and AJC were sponsored by
406 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and
407 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

408

409 **Conflict of interest statement**

410 This study does not present any conflicts of interest for its authors.

411

412 **5. References**

413 [1] Gatermann SG, Marre R. Cloning and Expression of *Staphylococcus*
414 *saprophyticus* Urease Gene Sequences in *Staphylococcus carnosus* and
415 Contribution of the Enzyme to Virulence. *Infect Immun* 1989;57:2998–3002.

416 [2] Raz R, Colodner R, Kunin CM. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*?
417 *Clin Infect Dis* 2005;40:896–8.

418 [3] Gatermann S, John J, Marre R. *Staphylococcus saprophyticus* urease:
419 Characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary
420 tract infection of rats. *Infect Immun* 1989;57:110–6.

- 421 [4] Gatermann SG, Kreft B, Marre R, Wanner G. Identification and characterization
422 of a Surface-associated protein Ssp of *Staphylococcus saprophyticus*. Infect
423 Immun 1992;60:1055–60.
- 424 [5] Gatermann SG, Meyer H-GW, Wanner G. Staphylococcus saprophyticus
425 hemagglutinin is a 160-Kilodalton surface polypeptide. Infect Immun
426 1992;60:4127–32.
- 427 [6] Hell W, Meyer H-GW, Gatermann SG. Cloning of aas, a gene encoding a
428 *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic
429 properties. Mol Microbiol 1998;29:871–81.
- 430 [7] Sankinc T, Kleine B, Gatermann SG. SdrI, a Serine-Aspartate Repeat Protein
431 Identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding
432 protein. Infect Immun 2006;74:4615–23.
- 433 [8] Matsuoka E, Tanaka Y, Kuroda M, Shouji Y, Ohta T, Tanaka I, et al. Crystal
434 structure of the functional region of Uro-adherence factor A from *Staphylococcus*
435 *saprophyticus* reveals participation of the B domain in ligand binding. Protein Sci
436 2011;20:406–16.
- 437 [9] King NP, Beatson SA, Totsika M, Ulett GC, Alm RA, Manning PA, et al. UafB
438 is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates
439 binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. Microbiology
440 2011;157:1161–75.
- 441 [10] Ravipaty S, Reilly JP. Comprehensive Characterization of Methicillin- resistant
442 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL Secretome by Two-dimensional
443 Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. Mol Cell Proteomics
444 2010;9:1898–919.
- 445 [11] Liew YK, Hamat RA, van Belkum A, Chong PP, Neela V. Comparative
446 Exoproteomics and Host Inflammatory Response in *Staphylococcus aureus* Skin
447 and Soft Tissue Infections, Bacteremia and Sub-Clinical Colonization. Clin
448 Vaccine Immunol 2015;22:CVI.00493–14. doi:10.1128/CVI.00493-14.
- 449 [12] Burlak C, Hammer CH, Robinson M-A, Whitney AR, McGavin MJ, Kreiswirth
450 BN, et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant
451 *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and
452 during infection. Cell Microbiol 2007;9:1172–90.
- 453 [13] Götz F, Yu W, Dube L, Prax M, Ebner P. Excretion of cytosolic proteins (ECP)
454 in bacteria. Int J Med Microbiol 2015;305:230–7.
455 doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.021.
- 456 [14] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, et
457 al. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets”
458 of the Secretome. Microbiol Mol Biol Rev 2004;68:207–33.

- 459 [15] Plessis DJF du, Nouwen N, Driessen AJM. The Sec translocase. *Biochim*
460 *Biophys Acta* 2011;851–65.
- 461 [16] Nijeholt JAL a, Driessen AJM. The bacterial Sec-translocase: structure and
462 mechanism. *Phil Trans R Soc B* 2012;367:1016–28.
- 463 [17] Quiblier C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Berger-Bächi B, Senn MM.
464 Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of
465 virulence factors. *BMC Microbiol* 2011;11.
- 466 [18] Quiblier C, Seidl K, Roschitzki B. Secretome Analysis Defines the Major Role of
467 SecDF in *Staphylococcus aureus* Virulence. *PLoS One* 2013;8.
- 468 [19] Natale P, Brüser T, Driessen a. JM. Sec- and Tat-mediated protein secretion
469 across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and
470 mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2008;1778:1735–56.
471 doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
- 472 [20] Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Bacterial Secretion Systems with an
473 Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Curr Issues Mol Biol*
474 2010;12:17–42.
- 475 [21] Berthet F-X, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A
476 *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-
477 molecular- mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998;144:3195–
478 203.
- 479 [22] Anderson M, Aly KA, Chen Y-H, Missiakas D. Secretion of atypical protein
480 substrates by the ESAT-6 Secretion System of *Staphylococcus aureus*. *Mol*
481 *Microbiol* 2013;90:734–43.
- 482 [23] Daleke MH, Ummelsa R, Bawonoc P, Heringa J, Vandenbroucke-Grauls CMJE,
483 Luirink J, et al. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion
484 pathway. *PNAS* 2012;109:11342–7.
- 485 [24] Lee J, Lee E-Y, Kim S-H, Kim D-K, Park K-S, Kim KP, et al. *Staphylococcus*
486 *aureus* Extracellular Vesicles Carry Biologically Active Beta-Lactamase.
487 *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2589–95.
- 488 [25] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed.
489 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 490 [26] Weber SS, Parente AFA, Borges CL, Parente JA, Bailão AM, Soares CM de A.
491 Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. *PLoS*
492 *One* 2012;7:1–19.
- 493 [27] Rezende TCV de, Borges CL, Magalhães AD, Sousa MV de, Ricart CAO, Bailão
494 AM, et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides*
495 *brasiliensis* using proteomics. *J Proteomics* 2011;75:572–87.

- 496 [28] Stapleton MR, Horsburgh MJ, Hayhurst EJ, Wright L, Jonsson I-M, Tarkowski
497 A, et al. Characterization of IsaA and SceD, Two Putative Lytic
498 Transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2007;189:7316–25.
- 499 [29] Lorenz U, Lorenz B, Schmitter T, Streker K, Erck C, Wehland J, et al. Functional
500 antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune
501 response and open new perspectives for antibacterial therapy. Antimicrob Agents
502 Chemother 2011;55:165–73. doi:10.1128/AAC.01144-10.
- 503 [30] Gaupp R, Ledala N, Somerville GA. Staphylococcal response to oxidative stress.
504 Front Cell Infect Microbiol 2012;2:1–19.
- 505 [31] Payne DE, Martin NR, Parzych KR, Rickard AH, Underwood A, Boles BR.
506 Tannic Acid Inhibits *Staphylococcus aureus* Surface Colonization in an IsaA-
507 Dependent Manner. Infect Immun 2013;81:496–504.
- 508 [32] Henderson B, Martin A. Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking
509 Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious
510 Disease. Infect Immun 2011;79:3476–91.
- 511 [33] Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-Phosphate
512 Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed
513 Plasminogen-Binding Protein. Infect Immun 2004;72:2416–9.
- 514 [34] Kolberg J, Aase A, Bergmann S, Herstad TK, Rødal G, Frank R, et al.
515 *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite
516 low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. Microbiology
517 2006;152:1307–17.
- 518 [35] Munier-Lehmann H, Chenal-Francisque V, Ionescu M, Chrisova P, Foulon J,
519 Carniel E, et al. Relationship between bacterial virulence and nucleotide
520 metabolism: a mutation in the adenylate kinase gene renders *Yersinia pestis*
521 avirulent. Biochem J 2003;373:515–22. doi:10.1042/BJ20030284.
- 522 [36] Busuioc M, Buttaro B a, Piggot PJ. The pdh operon is expressed in a
523 subpopulation of stationary-phase bacteria and is important for survival of sugar-
524 starved *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2010;192:4395–402.
525 doi:10.1128/JB.00574-10.
- 526 [37] Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Abe CM, Monaris D, Morais ZM, Souza
527 GO, et al. Interaction of *Leptospira* elongation factor tu with plasminogen and
528 complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting
529 activities. PLoS One 2013;8:e81818. doi:10.1371/journal.pone.0081818.
- 530 [38] Lee JC. *Staphylococcus aureus* Membrane Vesicles and Its Potential Role in
531 Bacterial Pathogenesis. J Bacteriol Virol 2012;42:181–8.

- 533 [39] Kainulainen V, Loimaranta V, Pekkala A, Edelman S, Antikainen J, Kylväjä R,
534 et al. Glutamine Synthetase and Glucose-6-Phosphate Isomerase Are Adhesive
535 Moonlighting Proteins of *Lactobacillus crispatus* Released by Epithelial
536 Cathelicidin LL-37. *J Bacteriol* 2012;2509–19.
- 537 [40] Furuya H, Ikeda R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface
538 of *Staphylococcus aureus* and alfa-(1-3)-mannooligosaccharides derived from
539 glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*
540 2009;155:2707–13.
- 541 [41] Laouami S, Messaoudi K, Alberto F, Clavel T, Duport C. Lactate dehydrogenase
542 A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in
543 *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 2011;193:1757–66. doi:10.1128/JB.00024-11.
- 544 [42] Phan V, Belas R, Gilmore BF, Ceri H. ZapA, a virulence factor in a rat model of
545 *Proteus mirabilis*-induced acute and chronic prostatitis. *Infect Immun*
546 2008;76:4859–64. doi:10.1128/IAI.00122-08.
- 547 [43] Somerville GA, Proctor RA. At the crossroads of bacterial metabolism and
548 virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev*
549 2009;73:233–48. doi:10.1128/MMBR.00005-09.
- 550 [44] Valderas MW, Hart ME. Identification and Characterization of a Second
551 Superoxide Dismutase Gene (sodM) from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*
552 2001;183:3399–407.
- 553 [45] Wasim M, Bible AN, Xie Z, Alexandre G. Alkyl hydroperoxide reductase has a
554 role in oxidative stress resistance and in modulating changes in cell-surface
555 properties in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* 2009;155:1192–202.
- 556 [46] Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A-J, Collignon A, Barc M-C,
557 Bourlioux P, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell
558 adherence. *Microbiology* 2001;147:87–96.
- 559 [47] Gomes CS, Izar B, Pazan F, Mohamed W, Mraheil MA, Mukherjee K, et al.
560 Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance
561 and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo. *PLoS One*
562 2011;6:e24965. doi:10.1371/journal.pone.0024965.
- 563 [48] Bigot A, Botton E, Dubail I, Charbit A. A homolog of *Bacillus subtilis* trigger
564 factor in *Listeria monocytogenes* is involved in stress tolerance and bacterial
565 virulence. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6623–31. doi:10.1128/AEM.00624-
566 06.
- 567 [49] Sibbald MJJB, Ziebandt a K, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen
568 HJM, et al. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by
569 comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:755–88.
570 doi:10.1128/MMBR.00008-06.

- 571 [50] Mackey-Lawrence NM, Jefferson KK. Regulation of *Staphylococcus aureus*
572 immunodominant antigen B (IsaB). *Microbiol Res* 2013;168:113–8.
573 doi:10.1016/j.micres.2012.07.003.
- 574 [51] Richter SG, Derek Elli, Kim HK, Hendrickx APA, Sorg JA, Schneewind O, et al.
575 Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-
576 positive bacteria. *PNAS* 2013;110:3531–6.
- 577 [52] Kajimura J, Fujiwara T, Yamada S, Suzawa Y, Nishida T, Oyamada Y, et al.
578 Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine
579 amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol*
580 *Microbiol* 2005;58:1087–101. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04881.x.
- 581 [53] Muthukrishnan G, Quinn GA, Lamers RP, Diaz C, Cole AL, Chen S, et al.
582 Exoproteome of *Staphylococcus aureus* Reveals Putative Determinants of Nasal
583 Carriage. *J Proteome Res* 2011;10:2064–78.
- 584 [54] Eberhard T, Kronvall G, Ullberg M. Surface bound plasmin promotes migration
585 of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes.
586 *Microb Pathog* 1999;26:175–81.
- 587 [55] Nobre LS, Saraiva LM. Effect of combined oxidative and nitrosative stresses on
588 *Staphylococcus aureus* transcriptome. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:2563–
589 73.
- 590 [56] Visutthi M, Srimanote P, Voravuthikunchai SP. Responses in the Expression of
591 Extracellular Proteins in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Treated
592 with Rhodomyrtone. *J Microbiol* 2011;49:956–64.
- 593 [57] Ziebandt A-K, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJJB, Arends JP, et al.
594 Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus*
595 exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics*
596 2010;10:1634–44.

597 **Figure legends**

598 **Fig. 1. Protein secretion profile of *S. saprophyticus* during 6 hours of incubation**
599 **and evaluation of cell lysis.** A: PCR sensitivity for the *rpsa* gene was assessed using *S.*
600 *saprophyticus* genomic DNA (five dilutions) as a template (50 ng to 1 pg). PCR was
601 performed with 5 concentrations of genomic DNA: 50 ng (lane 1), 5 ng (lane 2), 50 pg
602 (lane 3), 5 pg (lane 4) and 1 pg (lane 5). A negative control without genomic DNA was
603 also performed (lane 6). B: PCR performed with the culture supernatant (2 µL) of *S.*
604 *saprophyticus* concentrated by a 3-kDa filter obtained after 1 hour (lane 1), 3 hours
605 (Lane 2) and 6 hours (lane 3) of incubation in BHI medium. C: Exoproteome profile of
606 *S. saprophyticus* after 1 hour (lane 1), 3 hours (lane 2) and 6 hours (lane 3).

607 **Fig. 2. Abundance (%) of secreted proteins identified in *S. saprophyticus*, in**
608 **agreement with its biological function.** The proteins identified were distributed in
609 biological function classes.

610 **Fig. 3. Exoproteome profile from *S. saprophyticus* and western blotting using**
611 **polyclonal antibodies against total exoproteome.** (A) Western-blotting with the three
612 polyclonal antibodies obtained in Balb/c mice against the total exoproteome from *S.*
613 *saprophyticus*. 1- Western blotting of the control pre-immune serum; 2- Western
614 blotting with polyclonal antibodies obtained from animal 2; 3- Western blotting with
615 polyclonal antibodies obtained from animal 3. (B) Representative 2-DE-PAGE profile
616 with secreted proteins from *S. saprophyticus* and (C) western blotting of immunogenic
617 proteins from the exoproteome performed with polyclonal antibodies against the total
618 exoproteome from *S. saprophyticus*. The circles in Panels B and C show the
619 immunogenic proteins, which were excised and identified by mass spectrometry.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

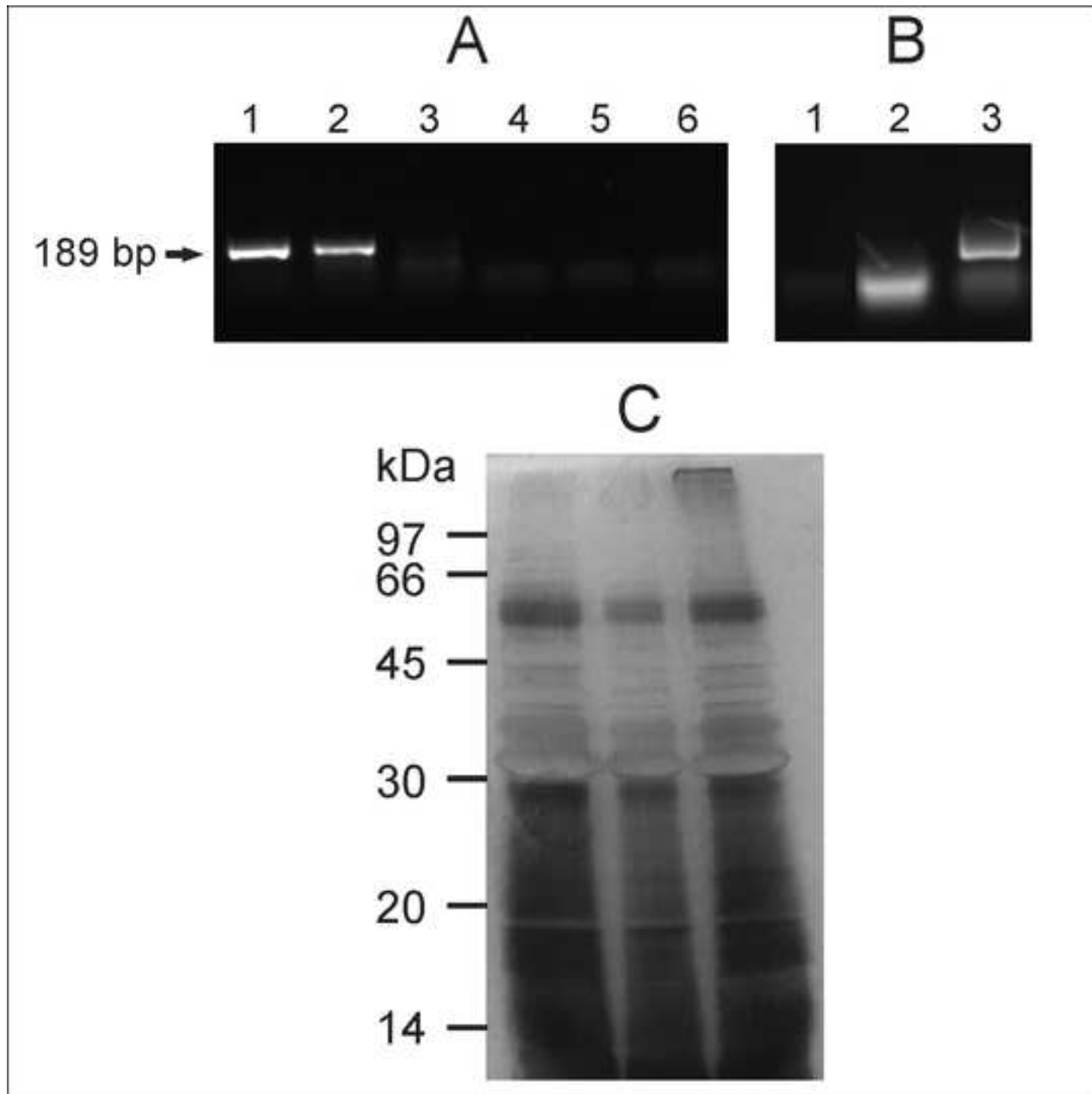


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

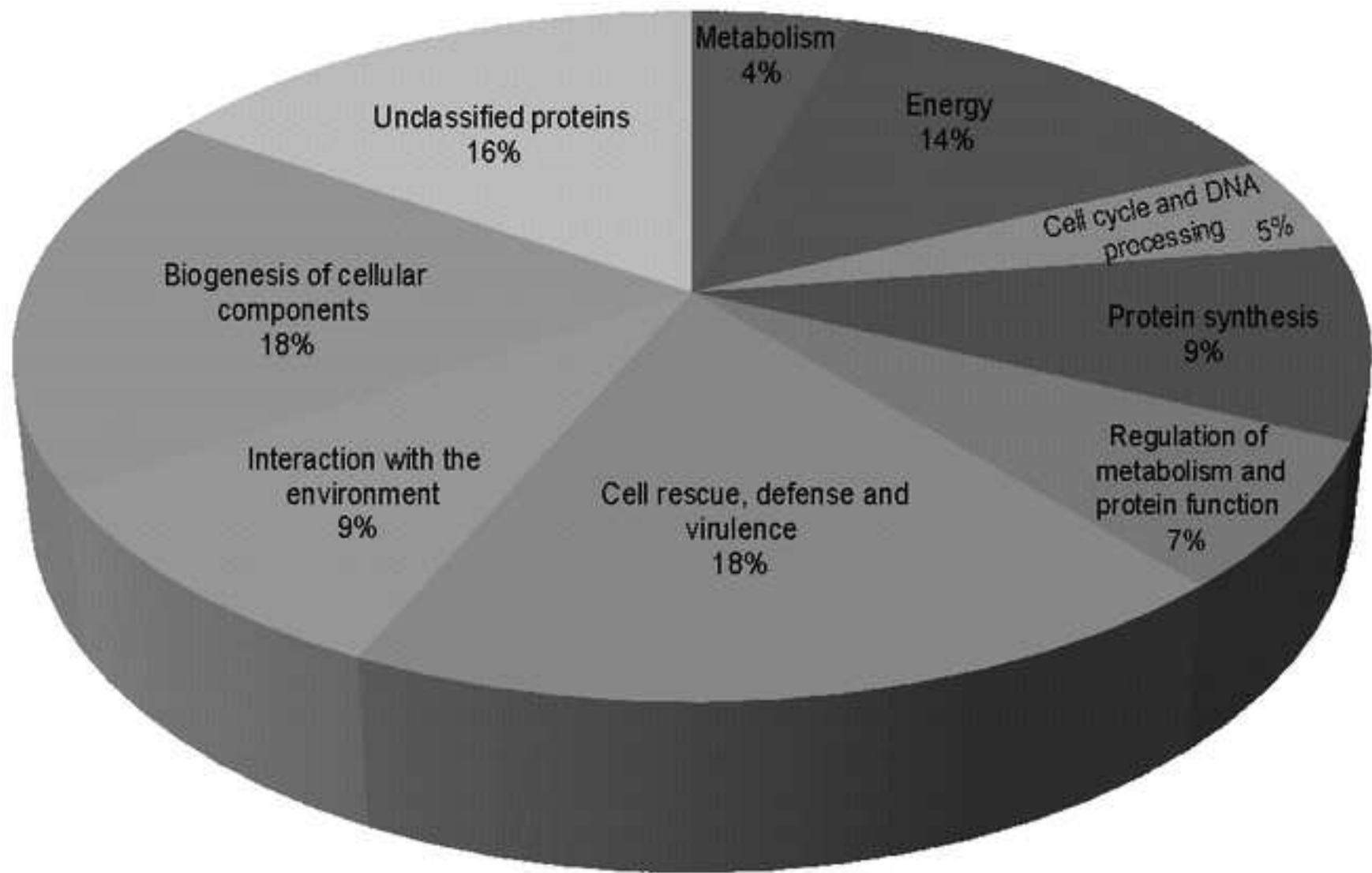


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

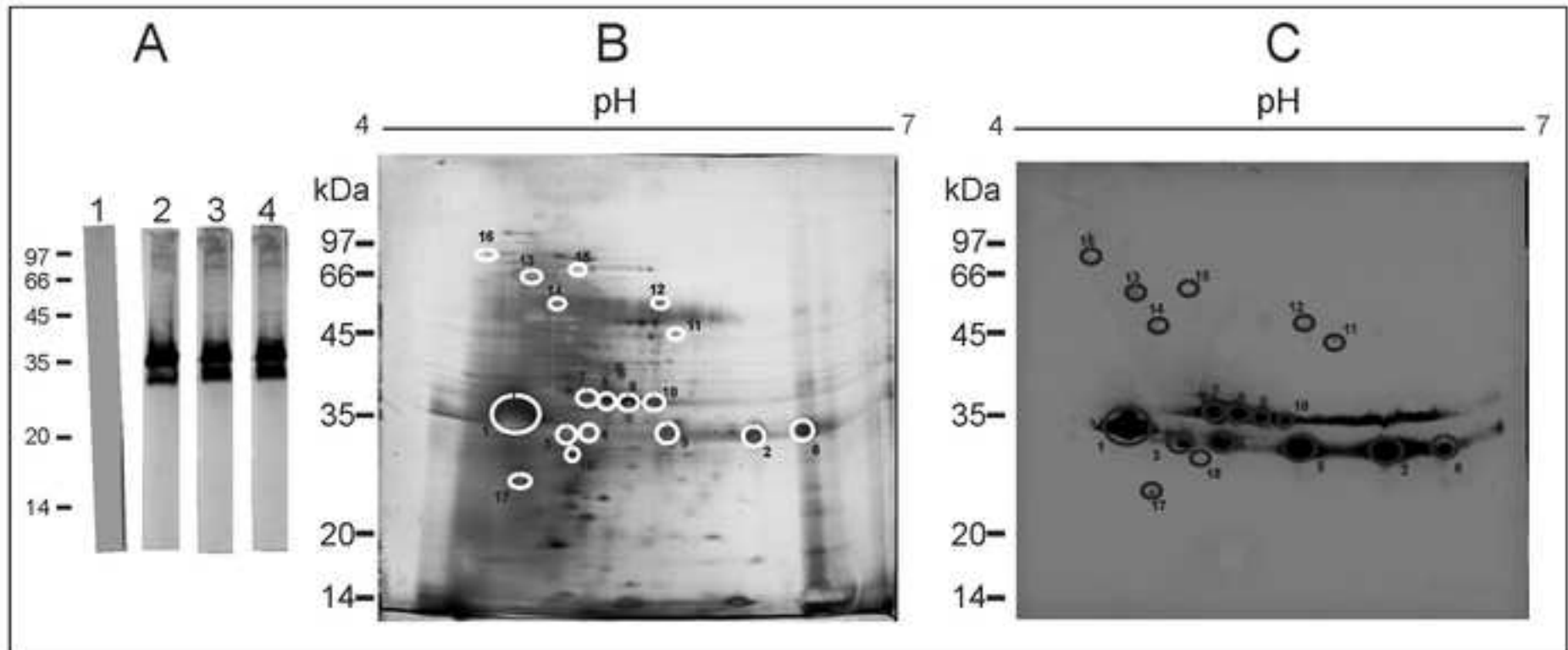


Table 1**Table 1.** List of secreted proteins identified from the *S. saprophyticus* exoproteome using nano-ESI-UPLC-MS^E.

Accession number ¹	Description	Protein sequence cover (%)	Prediction of localization LocateP ²	Classical secretion SignalP ³	Nonclassical secretion SecretomeP ⁴	Signal Peptide ⁵
1. Metabolism						
SSP0684	Adenylate kinase	6.48	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1575	Pseudouridine synthase	23.61	Cytoplasmic	No	Yes	-
2. Energy						
SSP1693	Dihydrolipoyl dehydrogenase	19.23	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1912	Enolase	38.48	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1813	Glucose-6-phosphate isomerase	31.38	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1916	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	34.63	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1914	Triosephosphate isomerase	40.71	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1001	L-lactate dehydrogenase	15.72	Cytoplasmic	No	No	-
10. Cell cycle and DNA processing						
SSP1654	Cell division protein ZapA	33.71	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1273	Nucleoid DNA-binding protein HU	73.33	Cytoplasmic	No	No	-
12. Protein synthesis						
SSP0667	30S ribosomal protein S19	40.22	Cytoplasmic	No	No	-
SSP2373	30S ribosomal protein S6	32.67	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1509	Ribosome-recycling factor	33.15	Cytoplasmic	No	Yes	-

SSP2207	Elongation factor Tu	35.44	Cytoplasmic	No	No	-
18. Regulation of metabolism and protein function						
SSP1738	Transcriptional regulator	9.07	Membrane	Yes	Yes	MNKFLKYFLIFLSLVLVVVPIIFAILLKSSQG
SSP0646	MarR family transcriptional regulator	20.69	Cytoplasmic	No	No	-
SSP0954	Transcriptional regulator	35.09	Cytoplasmic	No	No	-
32. Cell rescue, defense and virulence						
SSP2255	50S ribosomal protein L25	7.27	Cytoplasmic	No	No	-
SSP2333	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	23.81	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP0656	Glucose-1-dehydrogenase	36.5	Cytoplasmic	No	No	-
SSP0848	Molecular chaperone GroEL	7.04	Cytoplasmic	No	No	-
SSP0503	Small heat shock protein	40.97	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP1203	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	42.21	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP1056	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding protein	17.96	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1089	Trigger factor	16.74	Cytoplasmic	No	No	-
34. Interaction with the environment						
SSP0131	Immunodominant antigen	14.46	Membrane	Yes	Yes	MNQLVKVTLATGLALSAMVATTSSMT
SSP0613	Secretory antigen precursor	23.65	Extracellular	Yes	Yes	MKKIATATIATAGIATFAFAQHDADA
SSP0609	Secretory antigen precursor	10.32	Extracellular	Yes	Yes	MKKLVTATTLTAGIGAAIVGLDHGNEADA

SSP2136	Putative immunodominant antigen B	46.75	Membrane	Yes	Yes	MNKIAKTFVAGSIVFGTALGISVSNEGVSQTEA
---------	-----------------------------------	-------	----------	-----	-----	-----------------------------------

42. Biogenesis of cellular components

SSP1741	Bifunctional autolysin precursor (Aas)	46.62	Extracellular	Yes	Yes	MAKKKNTYKVPSIVALTLAGTALTTHHAQA
SSP2001	Lipoteichoic acid synthase	6.66	Membrane	Yes	Yes	MKLHKKKLTFFAFFILTVLTVTLKT
SSP0293	Transglycosylase IsaA	41.98	Extracellular	Yes	Yes	MKKTILASSLAVALGVTGYAATA
SSP0117	Transglycosylase SceD 1	37.82	Membrane	Yes	Yes	MKKTVVASTLAVGLGVTGFAAGNSADA
SSP0118	Transglycosylase SceD 2	33.73	Membrane	Yes	Yes	MKKTVIASLAVGLGVTGIAAGNSADA
SSP0788	Transglycosylase SceD 3	37.82	Membrane	Yes	Yes	MKKTVVASTLAVGLGVTGFAAGNSADA
SSP1961	Putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain	67.82	Extracellular	Yes	Yes	MKKGLTFSITSAALFFGMNHVASA
SSP0482	Transglycosylase	42.62	Membrane	Yes	Yes	MKKLLASFASITIAATGYGVTSTADA

99. Unclassified proteins

SSP2106	Putative uncharacterized protein	41.42	Extracellular	Yes	Yes	MKKLFAAVIVSGLALS GMSTGSVDA
SSP2326	Putative uncharacterized protein	26.81	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP1478	Putative uncharacterized protein	42.25	Cytoplasmic	No	No	-
SSP1699	Putative uncharacterized protein	11.11	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP1566	Putative uncharacterized protein	65.57	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP1109	Putative uncharacterized protein	26.92	Cytoplasmic	No	Yes	-
SSP0913	Putative uncharacterized protein	100	Cytoplasmic	No	No	-

¹ Accession number provided by the National Center of Biotechnology Information (NCBI. Web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

² Prediction of cellular sub-location of secreted proteins by *S. saprophyticus* using the bioinformatics tool LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>).

The score range of -1 to 1 was considered, with a threshold of 0.5 for sub-location possibility cytoplasmic/intracellular, membrane or extracellular with signal peptide.

³ Classical secretion prediction with a signal peptide through SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). All proteins with a cutoff of 0.57 for proteins without transmembrane regions and 0.45 for proteins with transmembrane regions were considered “predicted”.

⁴ Nonclassical secretion prediction using SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Only secreted proteins with a score ≥ 0.5 were considered 'predicted' as nonclassical pathway secretion.

⁵ Signal peptide prediction from Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) or Pedant (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>) algorithms.

Table 2. Identified immunogenic proteins from the *S. saprophyticus* exoproteome.

Spot number¹	Accession number²	Description
1	SSP0293	Transglycosylase IsaA
2	SSP0613	Secretory antigen precursor
4	SSP0613	Secretory antigen precursor
6	SSP0613	Secretory antigen precursor
14	SSP1912	Enolase

¹ Spot number corresponding to the numeration shown in Fig. 3

² Accession number provided by the National Center of Biotechnology Information (NCBI. Web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Table 3

Table 3. Proteins identified in the *S. saprophyticus* exoproteome and described as virulence factors in pathogens.

Accession number	Gene	Description	Organism	Reference
SSP0684	<i>adk</i>	Adenylate kinase	<i>Yersinia pestis</i>	[35]
SSP1912	<i>eno</i>	Enolase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[34]
SSP1693	<i>pdhD</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>Streptococcus mutans</i>	[36]
SSP1813	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Lactobacillus crispatus</i>	[39]
SSP1916	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[33]
SSP1914	<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	<i>Staphylococcus aureus</i>	[40]
SSP1001	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	<i>Bacillus cereus</i>	[41]
SSP1654	<i>zapA</i>	Cell division protein ZapA	<i>Proteus mirabilis</i>	[42]
SSP2207	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	<i>Leptospira</i> spp.	[37]
SSP0646	<i>marR</i>	MarR family transcriptional regulator	<i>Staphylococcus aureus</i>	[43]
SSP1203	<i>sodA</i>	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	<i>Staphylococcus aureus</i>	[44]
SSP2333	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	<i>Azospirillum brasilense</i>	[45]
SSP0848	<i>groEL</i>	Molecular chaperone GroEL	<i>Clostridium difficile</i>	[46]
SSP1056	<i>uspA</i>	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding protein	<i>Listeria monocytogenes</i>	[47]

SSP1089	<i>tig</i>	Trigger factor	<i>Listeria monocytogenes</i>	[48]
SSP0613	<i>ssaA</i>	Secretory antigen precursor	<i>Staphylococcus aureus</i>	[49], [38]
SSP0609	<i>ssaA</i>	Secretory antigen precursor	<i>Staphylococcus aureus</i>	[49], [38]
SSP2136	<i>isaB</i>	Immunodominant antigen B	<i>Staphylococcus aureus</i>	[50]
SSP1741	<i>aas</i>	Bifunctional autolysin	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ;	[6]
SSP2001	<i>ltaS</i>	Lipoteichoic acid synthase	<i>Staphylococcus aureus</i>	[51]
SSP0293	<i>isaA</i>	Transglycosylase IsaA	<i>Staphylococcus aureus</i>	[28], [29], [31]
SSP0117	<i>sceD1</i>	Transglycosylase SceD 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	[28]
SSP0118	<i>sceD2</i>	Transglycosylase SceD 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	[28]
SSP0788	<i>sceD3</i>	Transglycosylase SceD 3	<i>Staphylococcus aureus</i>	[28]
SSP1961	<i>lytM/sle1</i>	Putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	<i>Staphylococcus aureus</i>	[52]
