

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DOS GENES
CODIFICADORES DE FATORES SIGMA EM
Corynebacterium pseudotuberculosis EM RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

ESTUDANTE: **Brenda Silva Rosa da Luz**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Azevedo**

COORIENTADOR: **Prof. Dr. Thiago Luiz de Paula Castro**

BELO HORIZONTE

Maio de 2018

Brenda Silva Rosa da Luz

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DOS GENES
CODIFICADORES DE FATORES SIGMA EM
Corynebacterium pseudotuberculosis EM RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Luiz de Paula Castro

BELO HORIZONTE

Maio de 2018

043

Luz, Brenda Silva Rosa da.

Avaliação da atividade promotora dos genes codificadores de fatores sigma em *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a estresses abióticos [manuscrito] / Brenda Silva Rosa da Luz. - 2018.

124 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo. Coorientador: Prof. Dr. Thiago Luiz de Paula Castro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Fator sigma. 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 4. Regulação da expressão gênica. 5. Estresse abiótico - Teses. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Castro, Thiago Luiz de Paula. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

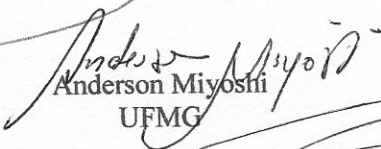


"Avaliação da atividade promotora dos genes codificadores de fatores sigma em *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a estresses abióticos"

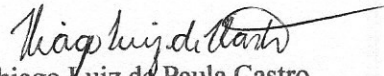
Brenda Silva Rosa da Luz

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG


Anderson Miyoshi
UFMG


Frederico Marianetti Soriani
UFMG


Thiago Luiz de Paula Castro
UFBA

Belo Horizonte, 30 de maio de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, aos meus irmãos, e aos meus melhores amigos, que sempre me apoiaram e acreditam em mim quando nem eu mesmo acreditava.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Aos professores Vasco Azevedo e Thiago Castro, pela importante orientação dada durante todos esses anos;

Ao pesquisador Alfonso Gala e à professora Núbia Seyffert pela ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho;

Ao professor Gustavo Menezes, por gentilmente oferecer o seu laboratório para a realização de experimentos de Citometria de fluxo;

Às agências de fomento de pesquisa, CNPq, FAPEMIG e CAPES;

À todos os funcionários da UFMG e do Instituto de Ciências Biológicas que trabalham para manter nosso local de trabalho;

À minha mãe, que apesar da distância, sempre torceu pelo meu sucesso e sempre me amou do seu jeito;

Ao meu irmão Carlos pelo amor e por ter sido um dos meus grandes exemplos e incentivos desde minha adolescência;

À minha irmã Ana, e aos meus sobrinhos Beatriz e João Vitor, por todo amor e carinho durante todos esses anos. Vocês são um grande presente pra mim;

Às minhas amigas, Tamíris e Sandra, por todos os anos de amizade e apoio, e todos os momentos felizes proporcionados, regados de risadas e brigadeiro;

Aos grandes amigos do Laboratório de Genética Celular e Molecular, que sempre estarão na minha memória;

A todos outros amigos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e que gastaria páginas citando...

Sumário

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. Introdução	17
1.1 Linfadenite Caseosa	18
1.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	20
1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais.....	20
1.2.2. Determinantes de virulência	21
1.3. Fatores sigma bacterianos	23
1.3.1. Propriedades gerais.....	23
1.3.2. Funções e implicação na virulência	26
1.3.3. Fatores sigma em Corinebactérias	28
1.4 <i>C. pseudotuberculosis</i> e sua susceptibilidade aos estresses	31
1.4.1 Estresse osmótico.....	31
1.4.2 Estresse oxidativo.....	32
1.4.3 Estresse de superfície celular.....	33
1.4.4 Ação de surfactantes	34
1.6. Justificativa.....	35
2. Objetivos	36
2.1. Objetivo Geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. Materias e Métodos	38
3.1. Equipamentos utilizados	39
3.2. Reagentes utilizados.....	40

3.3. Kits de Biologia Molecular	40
3.4. Preparação de soluções e meios de cultura	41
3.5. Linhagens bacterianas e condições de cultivo	42
3.6. Técnicas de transformação de DNA	42
3.6.1. Preparação de células eletrocompetentes e transformação <i>E. coli</i> .	42
3.6.2. Preparação de células eletrocompetentes e transformação em <i>C. pseudotuberculosis</i>	43
3.7. Manipulação de DNA	44
3.7.1. Amplificação de DNA por PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	44
3.7.2. Digestão enzimática.....	45
3.7.3. Resolução eletroforética em gel de agarose 1%	46
3.7.4. Purificação de DNA a partir de gel de agarose	46
3.7.5. Ligações de fragmentos de DNA a partir da enzima T4 DNA ligase	46
3.7.6. Extração plasmidial de <i>E. coli</i>	46
3.8. Construção dos plasmídios	47
3.8.1. Identificação de regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores sigma	47
3.8.2. Oligonucleotídeos confeccionados	48
3.8.3. Clonagem no pCR-Blunt.....	49
3.8.4. Subclonagem no vetor pSM20.....	49
3.8.5. Clonagem com Gibson Assembly	50
3.8.6. Sequenciamento e montagem dos plasmídios	51
3.9. Avaliação da ativação diferencial de promotores de fatores sigma em <i>C. pseudotuberculosis</i> por citometria de fluxo	52
3.9.1. Citometria de fluxo	52
3.9.2. Preparação das amostras.....	53
3.9.3. Parâmetros utilizados	53
3.9.4. Análises	54

4. Resultados e Discussão	57
4.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes	58
4.1.1. Identificação das regiões promotoras	58
4.1.2. Clonagens no vetor pCR-Blunt	62
4.1.2.1. Digestões com as endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Sph</i> I	67
4.1.3 Subclonagens no vetor pSM20	72
4.1.4 Clonagem no vetor pSM20 utilizando <i>Gibson Assembly</i>	76
4.1.5 Sequenciamento e montagem dos plasmídios	78
4.2. Indução das regiões promotoras em resposta a estresses abióticos.....	79
4.2.1 Indução da região promotora do gene <i>sigA</i>	84
4.2.2 Indução da região promotora do gene <i>sigB</i>	86
4.2.3 Indução da região promotora do gene <i>sigD</i>	88
4.2.4 Indução da região promotora do gene <i>sigE</i>	91
4.2.5 Indução da região promotora do gene <i>sigH</i>	93
4.2.6 Indução da região promotora do gene <i>sigC</i> , <i>sigK</i> e <i>sigM</i>	95
5. Conclusões e Perspectivas	99
6. Referências	102
7. Apêndices	116
Apêndice A - Região promotora do gene <i>sigA</i>	117
Apêndice B - Região promotora do gene <i>sigB</i>	118
Apêndice C - Região promotora do gene <i>sigC</i>	119
Apêndice D - Região promotora do gene <i>sigD</i>	120
Apêndice E - Região promotora do gene <i>sigE</i>	121
Apêndice F - Região promotora do gene <i>sigH</i>	122
Apêndice G - Região promotora do gene <i>sigK</i>	123
Apêndice H - Região promotora do gene <i>sigM</i>	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Etapas necessárias para iniciação da transcrição gênica bacteriana.	24
Figura 1.2 Organização estrutural dos domínios da família $\sigma 70$	26
Figura 3.1. Exemplo de análise feita pelo <i>Software</i> BPROM (<i>SoftBerry</i>).....	47
Figura 3.2. Mapas dos vetores plasmidiais utilizados nesse estudo.....	50
Figura 3.3. Representação esquemática da construção do plasmídio pSM20::P _{sigC}	51
Figura 3.4. Representação esquemática dos experimentos realizados para avaliação da indução diferencial de fluorescência pelas regiões promotoras do genes codificadores de fatores sigma de <i>C. pseudotuberculosis</i>	55
Figura 3.5. Representação esquemática da estratégia utilizada para análise dos resultados de citometria de fluxo no <i>Software</i> FlowJo.....	56
Figura 4.1. Predição das regiões promotoras de genes codificadores de fatores sigma de <i>C. pseudotuberculosis</i> numa região de aproximadamente 1000 pb à montante da ORF dos genes.....	60
Figura 4.2. Predição das possíveis regiões promotoras de genes codificadores de fatores sigma de <i>C. pseudotuberculosis</i> numa região de aproximadamente 1000 pb à montante da ORF dos genes.	61
Figura 4.3. Resolução eletroforética dos produtos de PCR obtidos com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma na linhagem 1002 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	62
Figura 4.4. Regiões promotoras amplificadas e suas respectivas regiões flanqueadoras no genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i>	64
Figura 4.5. Regiões promotoras amplificadas e suas respectivas regiões flanqueadoras no genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i>	65
Figura 4.6. Resolução eletroforética mostrando fragmentos de DNA gerados por PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores complementares às sequências do fago M13 presentes nas construções pCR-Blunt::P _{sig} , para confirmação das clonagens....	66
Figura 4.7. Resolução eletroforética dos produtos das reações de digestão realizadas utilizando diferentes construções pCR-Blunt::P _{sig} e endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Sph</i> I.....	68

Figura 4.8. Digestões realizadas com as endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Sph</i> I.	69
Figura 4.9. Representação esquemática das construções pCR-Blunt:: <i>P_{sigA}</i> , pCR-Blunt:: <i>P_{sigB}</i> , pCR-Blunt:: <i>P_{sigE}</i> , pCR-Blunt:: <i>P_{sigK}</i> , e pCR-Blunt:: <i>P_{sigM}</i>	70
Figura 4.10. Mapa genético das construções pCR-Blunt:: <i>P_{sigD}</i> e pCR-Blunt:: <i>P_{sigH}</i>	71
Figura 4.11. Resolução eletroforética dos produtos de PCR obtidos utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada região promotora e plasmídios referentes às construções pSM20:: <i>P_{sig}</i> , para a confirmação de clonagens	73
Figura 4.12 Resolução eletroforética das digestões realizadas utilizando as endonucleases de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Sph</i> I e os plasmídios referentes às construções pSM20:: <i>P_{sig}</i> , para confirmação das clonagens dos fragmentos.....	74
Figura 4.13. Representação esquemática das construções pSM20:: <i>P_{sig}</i>	75
Figura 4.14. Representação esquemática da construção pSM20:: <i>P_{sigC}</i>	77
Figura 4.15. Resolução eletroforética dos produtos de PCR e das digestões realizadas para a construção do plasmídio pSM20:: <i>P_{sigC}</i>	78
Figura 4.16. A figura representa a ativação da produção de GFP pelas linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> contendo as construções pSM20:: <i>P_{sig}</i> , em condições rotineiras de cultivo.	81
Figura 4.17. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem 1002 pSM20 (<i>promoterless</i>) a diferentes condições de estresse	83
Figura 4.18. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20:: <i>P_{sigA}</i> às condições de estresse.	85
Figura 4.19. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20:: <i>P_{sigB}</i> às condições de estresse.	87
Figura 4.20. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20:: <i>P_{sigD}</i> às condições de estresse.	90
Figura 4.21. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20:: <i>P_{sigE}</i> às condições de estresse.	92

Figura 4.22. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::P _{sigH} às condições de estresse.	94
Figura 4.23. Valores de frequência populacional produtora de GFP após estresses realizados com as linhagens 1002 pSM20::P _{sigC} , 1002 pSM20::P _{sigK} e 1002 pSM20::P _{sigM}	97
Figura 4.24. Panorama geral dos dados obtidos para indução diferencial de GFP pelas regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Fatores sigma de <i>Corynebacterium</i> e suas respectivas funções.....	30
Tabela 3.1 Condições de amplificação de DNA por PCR	45
Tabela 3.2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, seus alvos e tamanhos dos produtos amplificados esperados.....	48
Tabela 3.3 Condições de estresse aplicadas nos ensaios <i>in vitro</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – *Brain Heart Infusion*

CMNR – grupo composto pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*

ECF – Função extracitoplasmática

GFP – *Green Fluorescent Protein*

IDF – Indução Diferencial de Fluorescência

IMF – Intensidade Média de Fluorescência

LB – *Luria-Bertani*

LC – Linfadenite Caseosa

LPS – Lipopolissacarídeos

MCS – Sítio Múltiplo de Clonagem

NCR – Região não conservada

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PLD – Fosfolipase D

RB – Sítio de Ligação ao Ribossomo

RNAP – RNA polimerase

RNS – Espécies reativas de Nitrogênio

ROS – Espécies reativas de Oxigênio

SDS – Docecil sulfato de sódio

SP – Proteínas surfactantes

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis (Cp) é uma bactéria Gram-positiva e agente etiológico da Linfadenite Caseosa, uma doença que causa grandes perdas econômicas para a ovinocaprinocultura mundial. Este patógeno persiste por muito tempo dentro do hospedeiro ou no ambiente externo, resistindo a condições adversas. A ativação transiente dos fatores sigma da RNA polimerase fornece a adaptação necessária a variações ambientais. Um único fator sigma reconhece um conjunto específico de sequências promotoras no genoma bacteriano e pode ativar a expressão de centenas de genes fisiologicamente relacionados, permitindo que a célula bacteriana persista e sobreviva. No presente estudo, a indução diferencial da proteína verde fluorescente (GFP) foi avaliada, usando um citômetro de fluxo e os promotores de diferentes sequências codificantes do fator sigma. Para este propósito, os promotores dos genes sigA, B, C, D, E, H, K e M, em Cp, foram clonados a montante da sequência codificadora de GFP presente no vetor pSM20 sem promotor. Todas as construções plasmidiais foram obtidas utilizando a linhagem Top10 de *Escherichia coli* e confirmadas por digestão, PCR e sequenciamento de DNA. Posteriormente, a linhagem 1002 de Cp foi transformada com cada um dos plasmídios recombinantes. As linhagens resultantes foram cultivadas até o início da fase de crescimento exponencial e submetidas aos estresses oxidativo, osmótico e de superfície celular. O promotor P_{sigA} foi ativado sob alta osmolaridade e estresse de superfície celular induzido por SDS. P_{sigB} foi induzido apenas na presença de SDS. O P_{sigD} foi ativado após exposição a alta osmolaridade, SDS e estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. P_{sigE} e P_{sigH} foram ativados por SDS, mas desativados sob estresse osmótico e exposição a lisozima, respectivamente. P_{sigC}, P_{sigK} e P_{sigM} não foram induzidos por nenhuma das condições de estresse testadas neste estudo. Esses perfis de ativação / desativação demonstram a capacidade de nossas construções plasmidiais fornecerem informações relevantes sobre a atividade de fatores sigma, quando a Cp é submetida a várias condições ambientais. Atualmente, condições ambientais adicionais estão sendo testadas, a fim de obter uma melhor compreensão da regulação genética em Cp. Além disso, o presente estudo possibilitará a avaliação a ativação dos fatores sigmas intracelularmente, utilizando células de macrófagos murinos infectados *in vitro*.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis (*Cp*) is a Gram-positive bacterium and the etiological agent of Caseous Lymphadenitis, a disease that causes great economic losses in the sheep and goat industries worldwide. This pathogen persists for a long time within the host or in the external environment, resisting adverse conditions. The transient activation of the RNA polymerase sigma factors provides the adaptation to environmental variations. A single sigma factor recognizes a specific set of promoter sequences in the bacterial genome and may activate the expression of up to hundreds of physiologically related genes, allowing the bacterial cell to persist and survive. In the present study, the differential induction of the Green Fluorescent Protein (GFP) was evaluated, using a flow cytometer and the promoters from different sigma factor-encoding sequences. For this purpose, promoters from the genes *sigA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *H*, *K*, and *M*, in *Cp*, were cloned upstream the GFP-encoding sequence present in the promoterless pSM20 vector. All plasmid constructs were obtained using the strain Top10 of *Escherichia coli* and confirmed through digestion, PCR and DNA sequencing. Subsequently, the strain 1002 of *Cp* was transformed with each of the recombinant plasmids. The resulting strains were cultured until the beginning of the exponential growth phase and submitted to oxidative, osmotic and cell surface stresses. The promoter P_{sigA} was activated under high osmolarity and cell surface stress, induced by SDS. P_{sigB} was induced only in the presence of SDS. P_{sigD} was activated following exposure to high osmolarity, SDS and oxidative stress, induced by hydrogen peroxide. P_{sigE} and P_{sigH} were activated by SDS, but deactivated under osmotic stress and exposure to lysozyme, respectively. P_{sigC} , P_{sigK} and P_{sigM} were not induced by any of the stress conditions tested in this study. These activation/ deactivation profiles demonstrate the capacity of our plasmid constructs to provide relevant information on the activity of sigma factors, when *Cp* is submitted to various environmental conditions. Currently, additional environmental conditions are being tested, in order to achieve a better understanding of the genetic regulation in *Cp*. Also, the present study raises the possibility to assess intracellular sigma factor activation, using murine macrophage cells infected *in vitro*.

1. Introdução

1.1 Linfadenite Caseosa

Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença de grande importância veterinária causada pela bactéria patogênica *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Essa doença infectocontagiosa acomete, principalmente, ovinos e caprinos, entretanto, *C. pseudotuberculosis* também já foi isolada de outros animais como cavalos, camelos, búfalos, suínos e bovinos (BAIRD; FONTAINE, 2007). Aproximadamente cerca de 30 casos de infecção em humanos foram reportados pela literatura, o que caracteriza a LC como uma doença de potencial zoonótico, colocando em risco criadores de rebanhos e veterinários que de alguma maneira entram em contato direto com animais acometidos (BASTOS, 2012; HEGGELUND et al., 2015).

A LC pode causar perda de peso, redução da produção de leite e lã, além da condenação das carcaças de animais infectados, trazendo grandes prejuízos para a ovinocaprinocultura mundial (UMER et al., 2017). Essas perdas econômicas são significativas, principalmente, em países onde a ovinocaprinocultura é intensa, como Brasil, Inglaterra, França, Espanha, Estados Unidos, Canadá e Austrália (ALVAREZ et al., 2017; BAIRD; FONTAINE, 2007; KUMAR et al., 2012).

O Brasil detém cerca de 3% do rebanho mundial de ovinos e caprinos (EMBRAPA Semi-Árido, 2008) e apresenta ocorrência variável da doença no país. Estudos mostraram que na região nordeste cerca de 41,6% dos animais em rebanhos apresentaram abscessos superficiais palpáveis (UNANIAN; FELICIANO SILVA; PANT, 1985). Ainda na região nordeste, um estudo realizado com rebanhos ovinos provenientes dos estados da Paraíba, Pernambuco e Bahia detectou lesões similares à da LC em 15,9% dos animais, sendo *C. pseudotuberculosis* isolada desses abscessos em 74,5% dos casos (SOUZA et al., 2011). Outros estudos indicaram que a doença também apresenta grande prevalência na região sudeste, onde há uma prevalência de 75,8% em ovinos e 79,8% em caprinos em Minas Gerais, estado que tem tido grande crescimento no campo da ovinocaprinocultura (GUIMARÃES et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010).

Essa doença pode se apresentar de duas formas principais: externa ou interna. Na forma externa, a mais frequente da doença, ocorre a formação de abscessos nos nódulos linfáticos superficiais de ovinos e caprinos. Já na forma interna da doença, os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos viscerais ou órgãos como fígado, pulmão, baço e rim, podendo causar a morte do animal acometido (BAIRD; FONTAINE, 2007; WILLIAMSON, 2001). As duas formas da doença podem se desenvolver concomitantemente no mesmo animal (MERCHANT & PACKER, 1967).

A infecção por *C. pseudotuberculosis* se inicia, geralmente, através de lesões na pele, e se espalha rapidamente para o linfonodo mais próximo (JONES, 2000). O estabelecimento da infecção deve-se à capacidade desta bactéria sobreviver à fagocitose por macrófagos, ocorrendo repetidos ciclos de (1) replicação, (2) lise das células fagocíticas e (3) reinfecção de novos macrófagos (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997). Quando fagocitada, *C. pseudotuberculosis* não é capaz de impedir a fusão de fagolisossomos a lisossomos, o que cria um ambiente ácido e rico em proteases, lisozima, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997; ROHDE et al., 2007), demonstrando a grande capacidade adaptativa dessa bactéria a condições hostis.

A transmissão da LC pode ser direta ou indireta. Práticas comuns de manejo em rebanhos como a castração, marcação e tosa podem contribuir para a disseminação da doença, já que esses procedimentos ocasionam ferimentos na pele dos animais, facilitando a transmissão cutânea (ALVES; PINHEIRO, 1997). Além disso, também há indícios de que essa doença seja transmitida por via aérea, através de secreções expelidas no ar por animais com abscessos pulmonares (DORELLA et al., 2006; KURIA et al., 2001). O controle da doença é realizado, principalmente, pela remoção dos animais infectados do rebanho. Além disso, outras medidas profiláticas importantes impedem a disseminação da bactéria, como a esterilização de instrumentos de uso comunitário utilizados para tosa e marcação, bem como a higienização das instalações (ALVES; PINHEIRO, 1997).

Apesar de *C. pseudotuberculosis* ser susceptível a uma variedade de antibióticos em ensaios *in vitro*, quando os mesmos são administrados nos animais portadores da doença, a bactéria persiste ao tratamento devido a forma de manifestação da doença. O depósito de camadas concêntricas de tecido fibroso promovem formação dos abscessos caseosos, impedindo a ação dos antibióticos no local de infecção (WILLIAMSON, 2001). Apesar de vacinações serem realizadas nos rebanhos, a doença ainda persiste, pois as vacinas atualmente licenciadas não promovem proteção eficiente contra a enfermidade (LACASTA et al., 2015).

As estratégias utilizadas em vacinas para o combate à LC envolvem formulações contendo bactérias inativadas, sobrenadantes de cultura bacteriana, proteínas recombinantes, antígenos de parede bacteriana, vacinas de DNA e/ou combinações desses componentes (CAMERON et al., 1972; EGGLETON et al., 1991; FONTAINE et al., 2006; HODGSON et al., 1992, 1999; PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998). A proteção

conferida por essas vacinas são variadas, e também dependem da espécie do animal em questão (WILLIAMSON, 2001).

As principais vacinas comercialmente disponíveis são baseadas no principal fator de virulência descrito para *C. pseudotuberculosis*, a fosfolipase D (PLD). A vacina Glanvac™, amplamente utilizada na Austrália, foi inicialmente comercializada em 1984 e possui uma formulação composta de toxóides para o combate de *C. pseudotuberculosis* e outros patógenos como *Clostridium tetani*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* e *C. chauvoei* (DORELLA et al., 2006; HODGSON et al., 1994; WINDSOR; BUSH, 2016). Em 2006, Fontaine e colaboradores demonstraram que a vacina combinada de bactérias inativadas e PLD recombinante promovem maior proteção do que esses componentes administrados individualmente.

Linhagens atenuadas também têm sido utilizadas na tentativa de desenvolver vacinas eficazes. Como exemplo, uma linhagem deficiente para aquisição de ferro demonstrou conferir proteção de 80% após desafio com linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* (RIBEIRO et al., 2014). Uma vacina de DNA, consistindo de um vetor de expressão contendo o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* que codifica uma proteína de choque térmico, demonstrou induzir resposta imune, porém não foi capaz de prevenir a infecção (COSTA et al., 2011).

Outro candidato ao desenvolvimento de vacinas é o antígeno CP40, uma proteína imunogênica capaz de promover elevada proteção contra LC induzida experimentalmente (WALKER et al., 1994). Em 2016, DROPPA-ALMEIDA et al. demonstraram que a proteína recombinante CP40 de *C. pseudotuberculosis* foi capaz de induzir resposta imune e conferir 100 % de proteção após desafio com linhagem virulenta em modelo murino. Apesar disso, vacinas comercialmente disponíveis ainda não conferem proteção total contra a LC, e a busca de novos alvos tem sido uma prioridade (GALVÃO et al., 2017; SANTANA-JORGE et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

1.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma actinobacteria, Gram-positiva, pertencente ao grupo CMNR, composto pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (SONGER et al., 1988). Apesar de ser um grupo heterogêneo, as bactérias do CMNR compartilham algumas características

importantes, como genoma com conteúdo G+C de aproximadamente 50% e uma parede celular organizada em um grande complexo polimérico de arabinogalactano, peptidoglicano e ácidos micólicos (COLLINS; GOODFELLOW; MINNIKIN, 1982; GARG, 1985). Bactérias desse grupo se destacam tanto por seu potencial biotecnológico – como *C. glutamicum*, utilizada na produção de aminoácidos para a indústria – como por sua importância médica e veterinária – como *Mycobacterium tuberculosis*, causadora de tuberculose em humanos, e a própria *C. pseudotuberculosis*, causadora da LC.

C. pseudotuberculosis é uma bactéria pleomórfica, imóvel, possui fímbrias e não é capaz de formar cápsula ou esporos (BERNARD, 2012). *C. pseudotuberculosis* apresenta crescimento bacteriano ótimo à 37°C e pH entre 7,0 e 7,2, desenvolve-se em depósitos granulares em meio líquido, e se organiza em colônias opacas, concêntricas e de coloração creme alaranjado em superfície sólida (ágar) (DORELLA et al., 2006).

Propriedades bioquímicas de *C. pseudotuberculosis* podem variar muito, principalmente em relação à fermentação, que pode se dar a partir de diversas fontes de carbono como glicose, frutose, maltose, manose e sacarose (HOLT et al., 1994). *C. pseudotuberculosis* é beta-hemolítica, oxidase negativa, fosfolipase e catalase positiva (DORELLA et al., 2006; MUCKLE; GYLES, 1982), e pode ser diferenciada em dois biovaris de acordo com sua capacidade de reduzir nitrato: biovar *equi* – isolada, preferencialmente, de equinos e bovinos, nitrato positiva, e biovar *ovis* – isolada de ovinos e caprinos, nitrato negativa (BATEY, 1986).

1.2.2. Determinantes de virulência

Apesar do processo de infecção causado por *C. pseudotuberculosis* ser bem compreendido, pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos e moleculares relacionados à virulência e patogenicidade dessa bactéria, bem como sobre o controle da sua expressão gênica. Bactérias patogênicas, como *C. pseudotuberculosis*, enfrentam diversas condições hostis ao longo de sua vida, desde sua sobrevivência no meio ambiente até sua adaptação à resposta do sistema imune do hospedeiro durante o estabelecimento da infecção. Genes que permitem a sobrevivência da bactéria na transição dessas etapas, bem como genes responsáveis por causar a doença em si, são denominados determinantes de virulência (SCHUMANN, 2007).

Dentre os determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis* destacam-se, principalmente, os lipídeos tóxicos da parede celular e a fosfolipase D (PLD), ambos

bem caracterizados e descritos pela literatura. Os lipídeos de parede celular, especialmente os ácidos micólicos de cadeia curta, representam uma proteção contra a ação de enzimas degradativas do fagolisossomo durante o processo de infecção (RADOSTITS et al., 2002). Jolly (1965) demonstrou que linhagens mais virulentas de *C. pseudotuberculosis* possuem mais lipídeos na membrana do que linhagens atenuadas, sugerindo a relação direta entre a quantidade de lipídeos na parede celular e a virulência das linhagens. Além disso, foi observada a indução de necrose hemorrágica em cobaias após injeção intradérmica de material lipídico extraído, demonstrando sua ação tóxica (MUCKLE; GYLES, 1982). Os lipídeos presentes na parede celular também contribuem para a manutenção e sobrevivência da bactéria por longos períodos de tempo no meio ambiente, que pode chegar a até oito meses (BAIRD; FONTAINE, 2007).

A PLD, uma potente exotoxina com atividade esfingomielinase, também foi descrita como auxiliadora do estabelecimento da bactéria no hospedeiro, e é considerada o principal determinante de virulência de *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1999). Um estudo com uma linhagem mutante para o gene *pld* causou danos mínimos ao hospedeiro e a bactéria foi incapaz de se disseminar do sítio inicial de infecção para os linfonodos e de induzir o desenvolvimento da linfadenite caseosa (HODGSON et al., 1999; MCNAMARA; BRADLEY; SONGER, 1994). Isso porque essa exotoxina possui ação dermonecrótica e danifica células endoteliais, o que altera a permeabilidade dos vasos sanguíneos e promove o extravasamento da bactéria para os vasos linfáticos dando, conseqüentemente, acesso aos linfonodos (EGEN et al., 1989; SONGER, 1997). Além disso, estudos recentes demonstraram que a expressão desse gene aumenta de forma significativa quando a bactéria infecta macrófagos (MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007).

Outros candidatos a determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis* também foram descritos. Foi demonstrado que um conjunto de genes presentes no operon *fagABC* e o gene *fagD* codificam um sistema de permease de ferro, e, portanto, têm um papel na virulência de *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002). Considerando que essa bactéria é intracelular facultativa, é necessário que ela tenha desenvolvido mecanismos para adquirir ferro onde esse nutriente é escasso. Uma linhagem mutante para o gene *fagB(C)* apresentou diminuição na habilidade de persistir e causar abscessos em experimentos com caprinos (BILLINGTON et al., 2002). Outro estudo demonstrou que camundongos infectados com uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o sistema de aquisição de ferro apresentaram 80% de proteção após desafio, revelando que o sistema de captação de ferro é essencial para a sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro (RIBEIRO et al., 2014).

Um estudo de Mckean *et al.* (2005) demonstrou que os genes que codificam para uma subunidade da enzima propionil-CoA-carboxilase e uma sintetase peptídica não-ribossômica são ativados apenas durante infecção em macrófagos, podendo ser importantes determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis*. Estudos com a protease CP40, originalmente descrita por (WALKER *et al.*, 1994) como antígeno essencial na infecção causada por *C. pseudotuberculosis*, demonstraram que essa proteína confere proteção após desafio com linhagem altamente virulenta em modelo murino (DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2016).

1.3. Fatores sigma bacterianos

1.3.1. Propriedades gerais

A modulação da expressão gênica bacteriana também tem um papel essencial para a resposta adaptativa às mudanças rápidas do ambiente, sendo, portanto, crucial para o sucesso da infecção. A manutenção da homeostase bacteriana em ambientes adversos deve-se, principalmente, a sua capacidade de regular, de maneira coordenada, a transcrição de seus genes. Assim, estudos buscando novos determinantes de virulência de bactérias patogênicas, como *C. pseudotuberculosis*, tem se concentrado em identificar proteínas reguladoras de genes associados à resposta a modificações ambientais (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

Em procariotos, a transcrição gênica é iniciada a partir da ligação ao DNA da holoenzima da RNA polimerase, unidade que é constituída por cinco subunidades (α 2, β , β' e ω) e um fator sigma (σ) (Figura 1.1.A). Fatores sigma são subunidades de RNA que se associam transientemente ao cerne da RNA polimerase bacteriana para a formação de um complexo que possui afinidade pelo DNA e que promove o reconhecimento de sequências promotoras específicas, possibilitando o início da transcrição coordenada de conjuntos gênicos (ou *regulons*) fisiologicamente relacionados (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). *Regulons* controlados por um único fator sigma podem compreender centenas de genes, sendo eficientes no controle da expressão simultânea de diversos genes (PAGET; HELMANN, 2003).

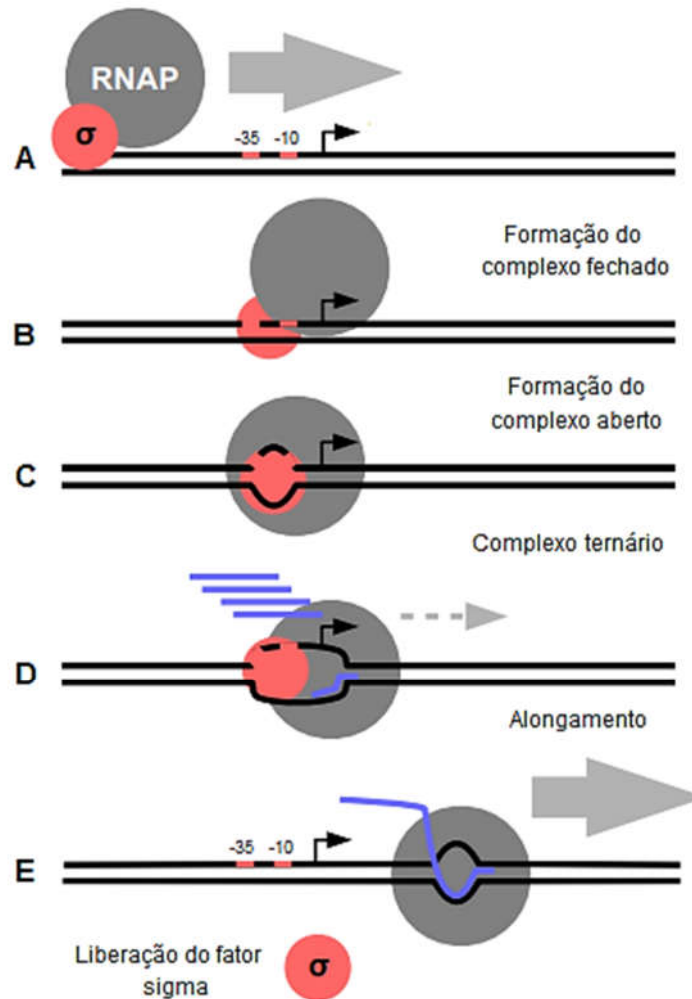


Figura 1.1 Etapas necessárias para iniciação da transcrição gênica bacteriana. A - O cerne da RNA polimerase associado ao fator sigma confere especificidade no reconhecimento de sequencias consensos -10 e -35 dos promotores gênicos. **B-** Primeiramente, a holoenzima da RNAP reconhece o promotor e se liga ao DNA formando o complexo fechado. **C-** Em seguida, mudanças conformacionais permitem o desenrolar da dupla fita de DNA formando o complexo aberto. **D-** A RNA polimerase transcreve vários RNAs pequenos (complexo ternário). **E** - Finalmente, o fator sigma é liberado e a RNAP inicia a transcrição da molécula de RNA. Adaptado: (TANIGUCHI, 2016).

Os fatores sigma podem ser divididos em duas famílias filogeneticamente distintas: família σ^{70} e família σ^{54} . Fatores sigma da família σ^{54} são relativamente raros e não são encontrados em bactérias Gram-positivas dos gêneros *Mycobacterium* e

Corynebacterium (SACHDEVA et al., 2010). Além disso, eles são estruturalmente distintos da família σ^{70} , apresentando baixa ou nenhuma similaridade (WÖSTEN, 1998).

A família σ^{70} pode possuir até quatro domínios conservados (regiões 1, 2, 3 e 4), os quais podem ser divididas em sub-regiões (Figura 1.2.B). Na porção amino-terminal se localiza a região 1, a qual foi associada com a inibição da ligação de fatores σ livres ao DNA; a porção 2 compreende quatro sub-regiões, sendo a 2.4 necessária para o reconhecimento da sequência consenso -10; na porção 3, a sub-região 3.0 está envolvida no reconhecimento da região -10 estendida de algumas bactérias; e na porção 4, a sub-região 4.2 compreende o domínio -35 da região promotora (PAGET; HELMANN, 2003).

Pelo menos um fator sigma primário, pertencente à família σ^{70} , está presente em todas as espécies de eubactérias e são responsáveis pela transcrição de genes essenciais (*housekeeping genes*) para o metabolismo da célula e crescimento exponencial em condições ótimas de cultivo em meio mínimo (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). Fatores sigma primários possuem todas as quatro regiões conservadas, e são pertencentes ao grupo 1. Por outro lado, fatores σ alternativos regulam a transcrição de genes não essenciais para o metabolismo, estando relacionados à resposta a estímulos ambientais (HELMANN, 2002). Dessa forma, a ativação transiente de fatores σ específicos permitem a transcrição de genes em resposta aos estresses, garantindo a manutenção da homeostase da célula e a adaptação necessária durante o curso de infecção por bactérias patogênicas (MANGANELLI, 2014; NEŠVERA; MIROSLAV, 2008).

Os fatores σ alternativos diferem dos fatores σ do grupo 1 pela completa ausência da região 1 e presença variável da região 3, e podem ser subdivididos em outros três grupos principais: (2) σ ativadores de respostas gerais ao estresse, que são estruturalmente similares ao grupo 1, exceto pela ausência da região 1; (3) σ envolvidos, principalmente, nas alterações morfológicas do organismo (não possuem a região 1 e podem conter ou não a região 3); e (4) σ ECF (do inglês, *Extracitoplasmatic function*), que estão envolvidos na resposta e adaptação a estímulos e mudanças no ambiente externo (CAMPAGNE; ALLAIN; VORHOLT, 2015; KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). Esta última classe, σ ECF, compreendem a mais numerosa e variável classe de fatores σ alternativos, contendo somente as regiões conservadas 2 e 4 (Figura 1.2.B) (RODRIGUE et al., 2006).

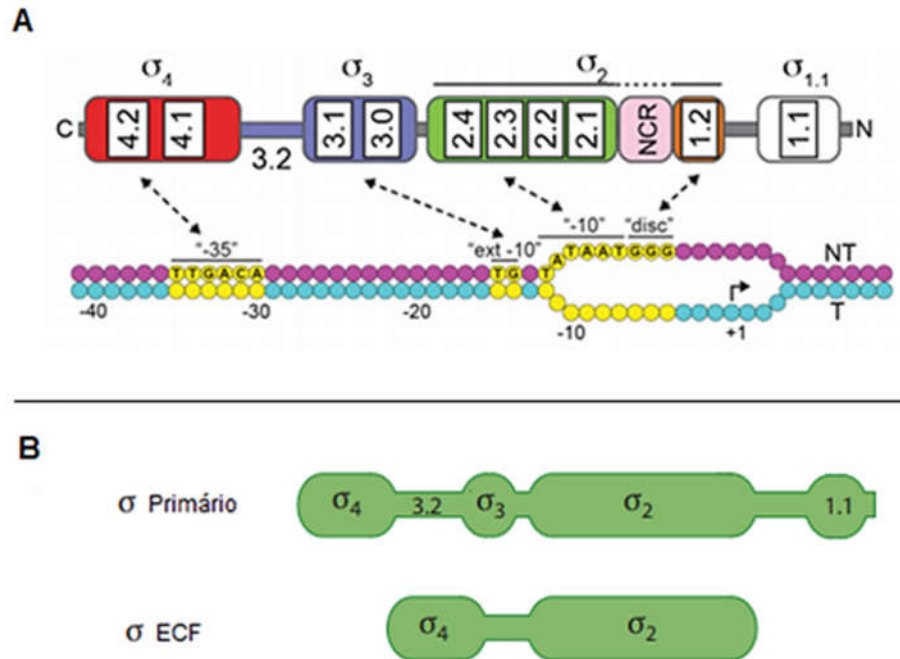


Figura 1.2 Organização estrutural dos domínios da família σ_{70} . **A.** Organização das regiões conservadas 1, 2, 3 e 4 com seus principais elementos consenso dos promotores gênicos. A transcrição é iniciada em +1. A região não conservada (NCR) é variável em tamanho e estrutura entre os fatores sigma primários. **B.** Representação estrutural dos fatores sigma primários – contendo as regiões conservadas 1, 2, 3 e 4, e dos fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) – contendo apenas as regiões conservadas 2 e 4.

Adaptado: (FEKLÍSTOV et al., 2014; PAGET, 2015).

1.3.2. Funções e implicação na virulência

Bactérias patogênicas possuem tanto genes de virulência, cujos produtos são essenciais para o estabelecimento da infecção bacteriana, quanto genes associados à virulência, cujas funções contribuem para a disseminação ou sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). Fatores sigma alternativos, a partir de estímulos ambientais particulares, podem regular a expressão tanto de genes de virulência quanto de genes associados à virulência, contribuindo direta ou indiretamente para a patogenicidade bacteriana (CHATURONGAKUL et al., 2008; KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

Dos fatores sigma alternativos pertencentes ao grupo 2, um dos mais bem estudados é o σ^S (também conhecido como σ^{38}) de *Escherichia coli*. Ele é responsável pela sobrevivência da bactéria durante a fase estacionária e atua na resposta geral ao estresse, influenciando a expressão de aproximadamente 500 genes quando a bactéria é exposta a diferentes condições ambientais (BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011; IHSEN; EGLI, 2004). Em bactérias Gram-positivas, o σ^B de *Bacillus subtilis* foi associado à regulação de pelo menos 127 genes relacionados a diversas funções, destacando-se aqueles que promovem resistência à acidez, altas temperaturas e ao etanol (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). Além disso, o fator σ^B foi apontado como sendo responsável pela resposta geral ao estresse em *Corynebacterium glutamicum*, na qual ele é expresso, principalmente, durante a transição da fase exponencial para a estacionária (NEŠVERA; MIROSLAV, 2008).

Os fatores sigma pertencentes ao grupo 3 estão envolvidos, principalmente, em alterações morfológicas do organismo, como formação de flagelos e esporos. Em *E. coli* a biossíntese de flagelos é controlada pelo σ^{28} (FliA), fator sigma estruturalmente similar ao de outras bactérias, incluindo Gram-positivas (PAGET, 2015). De fato, o ortólogo σ^D de *Bacillus subtilis* é capaz de complementar o mutante para *fliA* de *E. coli*, comprovando que suas sequências e funções são conservadas (CHEN; HELMANN, 1992). Ainda em *B. subtilis*, a formação de esporos é dependente de quatro fatores sigma pertencentes ao grupo 2, sendo eles σ^F , σ^E , σ^G e σ^K (HILBERT; PIGGOT, 2004).

Dentre os fatores σ alternativos destacam-se o do grupo 4, de função extracitoplasmática, pois estes são responsáveis pela regulação de genes relacionados à síntese de proteínas de envelope celular, proteases extracelulares e sistemas de influxo/efluxo de ferro, sendo essenciais na infecção por bactérias patogênicas (HELMANN, 2002; JORDAN; HUTCHINGS; MASCHER, 2007). A utilização de bancos de dados para a comparação de sequências de diferentes genomas bacterianos revelou uma grande variedade no número de genes codificadores de σ ECF entre diversos microrganismos, desde 0 em *Mycoplasma*, 2 em *E. coli*, 7 em *B. subtilis*, 10 em *M. tuberculosis*, até 83 em *Sorangium cellulosum* (HELMANN, 2002), podendo ser esse número correlacionado à variedade de habitats nos quais o microrganismo se encontra durante seu ciclo de vida (SACHDEVA et al., 2010).

M. tuberculosis, bactéria de grande importância médica, possui dez fatores sigma de função extracitoplasmática, sendo eles σ^C , σ^D , σ^E , σ^G , σ^H , σ^I , σ^J , σ^K , σ^L e σ^M (MANGANELLI, 2014; MANGANELLI et al., 1999). Dentre estes, foi sugerido que os fatores sigma σ^C , σ^D , σ^E , e σ^H tem papel importante na regulação de genes associados

à virulência (SOUZA et al., 2014). Estudos com uma linhagem mutante para o fator σ^E de *M. tuberculosis* demonstraram que essa bactéria é mais susceptível aos estresses oxidativo, térmico e de superfície induzido por dodecil sulfato de sódio (SDS) e também altamente atenuada em infecções experimentais com camundongos (MANGANELLI et al., 2001, 2004). Apesar do papel do fator σ^K de *M. tuberculosis* não ter sido elucidado, sabe-se que em *M. bovis* esse fator sigma controla a expressão de proteínas altamente imunogênicas, e que linhagens dessa espécie contendo mutações na região promotora do gene *sigK* apresentam virulência reduzida (CHARLET et al., 2005; FORRELLAD et al., 2013). A corinebactéria de interesse biotecnológico *C. glutamicum* não possui o σ^K , sugerindo que esse fator transcricional possa estar envolvido em algum mecanismo de virulência de bactérias patogênicas.

1.3.3. Fatores sigma em Corinebactérias

C. glutamicum, bactéria não-patogênica e de alto potencial biotecnológico, possui 5 fatores σ de função extracitoplasmática: σ^C , σ^D , σ^E , σ^H e σ^M , sendo que apenas os três últimos foram estudados mais detalhadamente. Ikeda et al. (2009) sugeriram que σ^D contribui para a sobrevivência da bactéria em condições de baixa concentração de oxigênio. Outro estudo demonstrou que uma linhagem de *C. glutamicum* mutante para o σ^E se tornou mais susceptível a estresses de superfície celular causados por lisozima ou SDS e ao estresse térmico (PARK et al., 2008).

Um estudo interessante sugeriu que o σ^H parece exercer um papel essencial na rede reguladora global de *C. glutamicum*, pois além de controlar a expressão de genes em resposta ao estresse oxidativo e térmico, esse fator sigma também está envolvido na transcrição dos genes *sigB*, *sigE* e *sigM* (PÁTEK; NEŠVERA, 2011; SOUZA et al., 2014). Finalmente, o σ^M de *C. glutamicum* está relacionado à regulação de genes codificadores de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e ao estresse térmico (NAKUNST et al., 2007).

Após o sequenciamento completo do genoma de *C. pseudotuberculosis*, agente causador da LC, foram identificadas através de análises comparativas uma sequência para o fator sigma primário σ^A e sete sequências de genes codificadores de fatores sigma alternativos, sendo eles o σ^B de resposta geral ao estresse e os sigmas σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M , de função extracitoplasmática (PACHECO, 2010). Apesar de identificados, os papéis dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* ainda não foram profundamente elucidados, existindo poucos estudos na área.

Alguns estudos realizados por nosso grupo buscaram compreender o impacto desses fatores transcricionais na regulação gênica global de *C. pseudotuberculosis*, principalmente em resposta a condições adversas de estresse. Castro (2009) realizou ensaios de estresse oxidativo para avaliar a expressão diferencial dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* utilizando a técnica de RT-PCR e observou um possível envolvimento dos fatores σ^C e σ^K em resposta a esse estresse. Além disso, foi sugerido que o σ^H desencadeia uma cascata de ativação de fatores σ sob essa condição, sendo sua transcrição seguida pela indução da transcrição dos fatores σ^M e σ^B . Como citado anteriormente, em *C. glutamicum* o σ^H também é responsável pela ativação de outros fatores sigma, o que sugere que o σ^H também pode estar associado a uma complexa rede de regulação em *C. pseudotuberculosis*, podendo ser responsável pela expressão de diversos genes em resposta a condições de estresse (CASTRO, 2009).

Outro estudo de nosso grupo observou que linhagens mutantes para os fatores σ^C e σ^H apresentaram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo quando comparadas a linhagem selvagem, sugerindo que eles possuem papel essencial na adaptação à esse estresse (CASTRO, 2013). Além disso, a linhagem mutante para o σ^C demonstrou ser bem mais atenuada em comparação à linhagem selvagem em um modelo de infecção com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, sugerindo que o σ^C pode estar associado à virulência de *C. pseudotuberculosis* (CASTRO, 2013).

Pinto *et al.* (2014) realizou um estudo em larga escala de genes diferencialmente expressos em *C. pseudotuberculosis* sob condições de estresses abióticos. Após exposição ao estresse osmótico (NaCl 2M) foi observado um aumento na expressão dos genes *sigA* e *sigM*, após estresse ácido (pH 5.5) houve indução da expressão dos genes *sigB*, *sigE* e *sigH*, e os genes *sigA* e *sigM* foram diferencialmente expressos após exposição ao estresse térmico (50°C) (PINTO *et al.*, 2014). Por fim, um estudo com uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator σ^E mostrou maior susceptibilidade aos estresses nitrosativo, ácido e de superfície induzido com SDS (PACHECO, 2010). Os mecanismos de resposta a esses estresses podem ser os mesmos ativados para o estabelecimento da bactéria durante a infecção, o que sugere uma possível relação entre esse fator sigma e a resposta adaptativa dessa bactéria (PACHECO, 2010). A Tabela 1.1 mostra os fatores sigmas e suas respectivas funções para duas espécies do gênero *Corynebacterium*.

Tabela 1.1 Fatores sigma de *Corynebacterium* e suas respectivas funções.

Espécie	σ	Gene	Funções	Referência
<i>C. glutamicum</i>	σ^C	<i>sigC</i>	A ser elucidado	Patek & Nesvera, 2011
	σ^D	<i>sigD</i>	Resposta a condições microaeróbicas	Ikeda <i>et al.</i> , 2009
	σ^E	<i>sigE</i>	Resposta a estresses nutricionais e de superfície celular, choque térmico, deficiência de magnésio, exposição prolongada a ácido láctico e condições microaeróbicas	Ikeda <i>et al.</i> 2009; Brockmann-Gretza, 2006; Park <i>et al.</i> 2008; Jakob <i>et al.</i> , 2007
	σ^H	<i>sigH</i>	Resposta ao choque térmico e estresse oxidativo	Patek e Nesvera, 2011
	σ^M	<i>sigM</i>	Resposta a estresses de alta e baixa temperatura e oxidativos	Nakunst, 2009
<i>C. pseudotuberculosis</i>	σ^C	<i>sigC</i>	Possivelmente envolvido na resposta ao estresse oxidativo	Castro, 2009, 2013
	σ^D	<i>sigD</i>	Possivelmente envolvido na virulência	Carvalho <i>et al.</i> , 2013
	σ^E	<i>sigE</i>	Resposta aos estresses causados por SDS, lisozima, ácido, óxido nítrico e óxido nítrico/peróxido	Pacheco <i>et al.</i> , 2012; Pinto <i>et al.</i> , 2014
	σ^H	<i>sigH</i>	Possivelmente envolvido na resposta ao estresse oxidativo	Castro, 2013
	σ^K	<i>sigK</i>	Ainda não determinado	-
	σ^M	<i>sigM</i>	Possivelmente envolvido na resposta ao estresse osmótico	Pinto <i>et al.</i> , 2014

Traduzido e Adaptado: SOUZA *et al.*, 2014

1.4 C. *pseudotuberculosis* e sua susceptibilidade aos estresses

Ao longo de sua vida, bactérias enfrentam condições abióticas e bióticas do ambiente na qual estão inseridas. Dentre os fatores abióticos (físicos e químicos), estresses como alterações bruscas na temperatura, alterações de pH e salinidade, disponibilidade de nutrientes, dentre outros, são comuns (STAROSTA et al., 2014). Além disso, bactérias patogênicas também interagem com componentes da resposta imune do hospedeiro durante o curso de infecção (RIBET; COSSART, 2015).

Geralmente, genes cujos produtos estão associados a resposta às condições abióticas ou à patogenicidade não são expressos de forma constitutiva e possuem regulação transitente. Dessa forma, estímulos específicos, celulares ou ambientais, são capazes de ativar fatores regulatórios capazes de ativar ou inibir a transcrição, ou influenciar algum outro evento que interfira na expressão gênica de forma que os produtos sintetizados na célula promovam a adaptação bioquímica e/ou física necessária (GOTTESMAN, 2017).

Como discutido anteriormente, os fatores sigma, primários ou alternativos, promovem a regulação coordenada da expressão de diversos genes de acordo com a necessidade celular. Assim sendo, esses fatores regulatórios são essenciais para a manutenção da homeostase da bactéria em resposta a diversas condições ambientais, o que reflete diretamente em sua sobrevivência e proliferação no ambiente e/ou hospedeiro (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

1.4.1 Estresse osmótico

Todos organismos necessitam manter um turgor celular que seja compatível com diversos processos como metabolismo, crescimento e divisão celular. Flutuações osmóticas alteram a pressão do turgor celular, podendo prejudicar o enovelamento de proteínas e, conseqüentemente, a atividade metabólica (SLEATOR; HILL, 2002). Na presença de meio hipertônico a desidratação do citoplasma pode ocasionar plasmólise celular; já meios com baixa osmolaridade podem levar a lise celular caso haja entrada excessiva de água. Os organismos são capazes de neutralizar essas mudanças osmóticas pela expulsão ou acumulação compensatória de solutos compatíveis, restaurando assim o equilíbrio celular (CSONKA, 1989; HATZIOS et al., 2013).

Microrganismos colonizam vários ambientes e precisam ser capazes de responder de forma rápida aos choques osmóticos ocasionados pelas transições entre diferentes ambientes de crescimento. A expressão de fatores de virulência de bactérias

patogênicas já foi associada ao aumento da osmolaridade do meio (CHOWDHURY; SAHU; DAS, 1996). Foi observado que em *Shigella flexneri* condições de alta osmolaridade provocam a indução da expressão de genes responsáveis pela invasão de células epiteliais (BERNARDINI; FONTAINE; SANSONETTI, 1990).

Em bactérias, duas estratégias principais foram descritas para a adaptação à alta osmolaridade: acúmulo de altas concentrações de sal no citoplasma e o acúmulo de osmoprotetores. O primeiro processo é utilizado por organismos que toleram altíssimas concentrações salinas como as halobactérias, que habitam ambientes extremos (CIULLA, 1999; OREN, 2008). Por outro lado, o acúmulo de moléculas osmoprotetoras auxiliam na manutenção do turgor celular pois são altamente solúveis, não possuem carga em pH fisiológico e não interagem com proteínas citoplasmáticas, não perturbando, portanto, os processos celulares básicos (TRUPER, 1994).

C. pseudotuberculosis é capaz de se adaptar às oscilações osmóticas que enfrenta tanto no ambiente externo, quanto durante seu curso de infecção no hospedeiro, onde persiste às transições que ocorrem entre o epitélio, os macrófagos, a invasão dos vasos linfáticos, e finalmente ao estabelecimento das lesões nos linfonodos caseosos (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997; EGEN et al., 1989; SONGER, 1997), o que demonstra a sua habilidade de contornar as mudanças bruscas de osmolaridade entre esses ambientes.

1.4.2 Estresse oxidativo

Em organismos aeróbios o oxigênio molecular (O_2) é utilizado como acceptor final de elétrons durante o metabolismo celular, e a redução parcial do O_2 por enzimas da cadeia respiratória pode promover a formação subprodutos denominados espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de oxigênio (H_2O_2) e radical reativo de hidroxila (OH^{\cdot}) (LUSHCHAK, 2014). Em procariotos a maioria das ROS intracelulares são produtos da respiração, o que foi observado, por exemplo, em *E. coli*, no qual um estudo demonstrou que cerca de 87% do H_2O_2 é gerado pela cadeia respiratória (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995).

Diversos componentes celulares – como DNA e proteínas – são vulneráveis à ação das ROS. As ROS podem causar oxidação na estrutura do cromossomo bacteriano, levando à mudanças no DNA que, se não reparadas, resultam no mau pareamento de bases nucleotídicas durante a replicação e, conseqüentemente, mutações nas células-filhas (BRUNER; NORMAN; VERDINE, 2000; COOKE et al.,

2003). O exemplo mais comum de alteração no DNA devido às ROS é a oxidação da guanina, que origina a 8-oxo-desoxiguanina. Diferente da guanina, que apresenta alta afinidade pela citosina (C), a 8-oxo-desoxoguanina se liga com mais facilidade à adenina (A), o que pode levar a uma mutação do tipo transversão (C → A) durante a replicação (NEELEY; ESSIGMANN, 2006).

Apesar das ROS serem geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, esses subprodutos também podem ser encontrados no ambiente extracelular. Bactérias patogênicas, por exemplo, são expostas ao estresse oxidativo presente no ambiente fagossomal, onde as ROS atuam como importante mecanismo de defesa de macrófagos (WEISS; SCHAIBLE, 2015). Em resposta a esse estresse, a ativação de mecanismos de detoxificação e reparação aos danos celulares são cruciais para a sobrevivência e persistência bacteriana. Considerando que *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo, pode-se supor que o sucesso na infecção da mesma se deve à presença redes regulatórias que permitem a manutenção da integridade celular diante do estresse oxidativo.

1.4.3 Estresse de superfície celular

Os microrganismos podem entrar em contato com diversas substâncias tóxicas e/ou deteriorantes que podem causar danos à sua estrutura celular, tanto no meio externo, quanto nas interações célula-hospedeiro. Durante a infecção, componentes imunomodulatórios e de defesa podem ser ativados pelo hospedeiro em resposta ao patógeno invasor na tentativa de impedir o estabelecimento da doença.

Células fagocíticas, como os macrófagos, geram um ambiente intracelular hostil para o organismo invasor que precisa resistir a muitos estresses como alta atividade enzimática, (ROHDE et al., 2007). Uma enzima muito importante encontrada no ambiente fagossômico é a lisozima, molécula que apresenta alta atividade antimicrobiana devido à sua habilidade de hidrolisar componentes da camada de peptidoglicano, este presente na membrana celular bacteriana (HANNIG et al., 2005).

A ação enzimática da lisozima é degradativa e gera o aumento da permeabilidade da membrana celular, ocasionando desequilíbrio eletrolítico e mudanças na osmolaridade (HANNIG et al., 2005). No curso de infecção, *C. pseudotuberculosis* é capaz de repetir ciclos de infecção, lise e reinfecção de macrófagos (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997), mostrando sua resistência e capacidade de adaptação a esse estresse.

1.4.4 Ação de surfactantes

Surfactantes são conjuntos de macromoléculas de complexos lipoproteicos que podem variar em composição, estrutura e função. Eles são formados de fosfolipídeos (90%) e proteínas (10%), das quais predominam as proteínas surfactantes (SP) hidrofóbicas SP-B e SP-C e as proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D (PASTVA; WRIGHT; WILLIAMS, 2007). A principal função dos surfactantes é reduzir a tensão superficial dentro do alvéolo pulmonar formada pela interface entre o líquido e o ar, impedindo seu colapso durante a respiração (SORENSEN, 2018).

Apesar de ter sido originalmente descrito como detentor de função pulmonar, estudos recentes indicaram que algumas proteínas surfactantes também regulam a resposta imune do hospedeiro (ZHANG et al., 2015). Estudos mostraram que apenas a proteína SP-B é necessária para a função de redução de tensão de superfície, e que a proteína SP-C, por outro lado, foi associada à ligação ao Lipopolissacarídeos (LPS) que é um componente da membrana bacteriana (PASTVA; WRIGHT; WILLIAMS, 2007). Além disso, a defesa do hospedeiro é mediada pelas proteínas SP-A e SP-D, duas colectinas que ajudam no reconhecimento de padrões moleculares de partículas exógenas e aumentam a fagocitose bacteriana por células imunes como macrófagos e neutrófilos (PASTVA; WRIGHT; WILLIAMS, 2007).

A proteína SP-D já foi localizada tanto no pulmão, quanto em outros tecidos como digestivo, glandular, trato reprodutivo, epitélio vascular e glândulas (SORENSEN, 2018). Um estudo recente demonstrou que a proteína SP-D tem efeito protetivo na ceratite (inflamação da córnea) causada por *Staphylococcus aureus*, pois diminui a invasão bacteriana das células epiteliais (ZHANG et al., 2015).

M. tuberculosis, bactéria filogeneticamente relacionada à *C. pseudotuberculosis*, tem contato direto com surfactantes nas células pulmonares durante a infecção. Ensaio utilizando o SDS, um surfactante aniônico, demonstraram a ativação de alguns fatores sigma de *M. tuberculosis*, indicando que esse composto interfere na regulação gênica dessa bactéria em resposta a esse estresse (MANGANELLI, 1999). *C. pseudotuberculosis* causa, principalmente, lesões nos linfonodos superficiais, porém, a forma visceral da doença também pode atingir órgãos como o pulmão (BATEY, 1986; HEGGELUND et al., 2015), o que sugere que essa bactéria possui a capacidade de sobreviver em ambientes com alta concentração de surfactantes. Além disso, como discutido anteriormente, os surfactantes também possuem atividade imunomodulatória, podendo atuar como agente de estresse durante a infecção causada por *C. pseudotuberculosis* em outros órgãos.

1.6. Justificativa

A Linfadenite Caseosa é uma doença de distribuição mundial que causa grandes prejuízos econômicos para a ovinocaprinocultura (UMER et al., 2017). O processo infeccioso causado por *C. pseudotuberculosis*, agente etiológico da enfermidade, é bem compreendido, porém existem poucos relatos sobre os mecanismos de regulação gênica envolvidos na virulência e patogenicidade.

C. pseudotuberculosis pode enfrentar diversas condições hostis tanto no meio ambiente quanto nas etapas do seu estabelecimento no hospedeiro. Os mecanismos envolvidos na habilidade desse patógeno de se adaptar e manter a homeostase diante de diversos estresses estão relacionados à ativação de fatores transcricionais específicos, como os fatores sigma. Os fatores sigma são capazes de promover especificidade no reconhecimento de promotores para o início da transcrição gênica e permitir o controle da expressão de genes possivelmente envolvidos na resposta a estresses ambientais ou associados à virulência (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

McKean et al (2005, 2007) realizaram estudos da regulação gênica de *C. pseudotuberculosis* através de IDF, utilizando o gene repórter GFP presente no vetor plasmidial pSM20 sem região promotora (*promoterless*). Esse vetor é uma ferramenta útil para o estudo genético de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que sequências gênicas promotoras podem ser clonadas a montante da região codificadora de GFP, de modo que se torne possível a avaliação da produção desta proteína através da metodologia de citometria de fluxo (MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007, 2005). A avaliação da indução de GFP, sob o controle dos promotores gênicos dos fatores σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M de *C. pseudotuberculosis*, constitui um método promissor para o estudo das funções desses reguladores transcricionais em resposta a estresses ambientais específicos.

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar a indução da produção de GFP sob o controle das regiões promotoras dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* em resposta aos estresses osmótico, oxidativo e de superfície celular induzido por lisozima e pelo surfactante SDS para melhor compreender os papéis desses fatores transcricionais na regulação gênica de *C. pseudotuberculosis* em resposta a condições adversas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade dos promotores dos genes que codificam fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* em resposta a várias condições de estresse ambiental.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e isolar as regiões promotoras dos genes codificadores dos σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M de *C. pseudotuberculosis*;
- Clonar as regiões promotoras no plasmídio comercial pCR-Blunt;
- Clonar as regiões promotoras a montante do gene *gfp* do plasmídio pSM20 por meio de subclonagem ou da estratégia *Gibson Assembly*;
- Confirmar as construções através das técnicas de PCR, digestão enzimática e sequenciamento;
- Obter linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* 1002 contendo as construções pSM20::*P_{sig}* transformadas individualmente;
- Padronizar as condições ideais para a ativação dos promotores dos fatores sigma por meio de citometria de fluxo;
- Identificar promotores de fatores sigma que são ativados, diferencialmente, em *C. pseudotuberculosis* em resposta aos estresses osmótico, oxidativo e de superfície celular induzido por lisozima e SDS.

3. Materias e Métodos

3.1. Equipamentos utilizados

- Agitador magnético de soluções “Speedlab” (TradeLab)
- Agitador tipo vortex (Scientific Industries)
- Analisador de amostras “NanoDrop™ 2000” (Thermo Fisher Scientific)
- Aparato para eletroforese “Horizon® 58” (Gibco®)
- Autoclave (Phoenix)
- Balança eletrônica (Shimadzu)
- Banho-maria (Precision)
- Capela de manipulação “DNA Workstation” (Loccus Biotecnologia)
- Capela de exaustão química (Permutation®)
- Centrífuga “5417C” (Eppendorf)
- Centrífuga refrigerada “MR 23i” (Jouan)
- Cubeta de eletroporação (BioRad)
- Destilador de água “Direct-Q® 3” (Millipore™)
- Eletroporador (BioRad)
- Espectrofotômetro (BEL Engineering)
- Estufa Incubadora de Bancada Refrigerada CT-712R (CIENTEC)
- Estufa de secagem e esterilização (Fanem®)
- Fluxo laminar classe II (Esco)
- Fonte para eletroforese (GSR 200STD Power Supply)
- Forno Microondas (Brastemp)
- Freezer -20°C (Electrolux)
- Freezer -80°C (Sanyo)
- Geladeira (Brastemp)
- Incubadora do tipo shaker (Nova ética)
- Micropipetas “Pipetman®” (Gilson) / “Finnipipette® F3” (Thermo Fisher Scientific)
- Sequenciador de DNA NGS (Illumina, San Diego, Ca, USA)
- Termociclador (MyGene Series Peltier MG96+)
- Transiluminador UV (DNR Transilluminator 101-0-00)

3.2. Reagentes utilizados

- Agarose padrão (Agargen)
- Água destilada esterilizada em autoclave
- Água mili-Q esterilizada em autoclave
- Azul de Bromofenol (PlusOne)
- Brometo de Etídio (EurobioTM)
- *Brain Heart Infusion* (BHI) (HiMedia)
- EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético, Vetec®)
- Etanol (Synth®)
- Extrato de Levedura (Kasvi)
- Lisozima (Sigma®)
- NaCl (Synth®)
- Peptona (Kasvi)
- Peróxido de hidrogênio 32% (Synth®)
- Tris-base (Promega)
- Tween® 80 (Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO, Sigma Aldrich®)

3.3. Kits de Biologia Molecular

- 1 kb Plus DNA LadderTM (InvitrogenTM)
- BamHI-HF® | NEB
- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)
- Plasmid DNA Purification Kit QIAGEN®
- Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- SphI-HF® | NEB
- T4 DNA Ligase (NEB)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific)

3.4. Preparação de soluções e meios de cultura

- **Brometo de Etídio:** estocar a 5 mg/ml; utilizar a 0,1-0,5 µg/ml. Conservar ao abrigo da luz.
- **Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%:** Dissolver 1 g em 100 mL de água destilada. Armazenar em vidro âmbar.
- **Etanol 70%:** diluir 70 mL de etanol em 30 mL de água destilada. Armazenar em tubos de 50 mL estéreis e manter resfriado para utilização como reagente.
- **Glicerol 10%:** diluir 100 mL de glicerol em 900 mL de água destilada. Esterilizar a mistura em autoclave por 20 min a 1,05 kg/cm².
- **Lisozima 10 mg/mL:** dissolver 20 mg em água mili-Q. Utilizar imediatamente.
- **Meio *Luria-Bertani* (LB) e placas LB ágar:** adicionar 10 g Peptona, 5 g NaCl e 5 g Extrato de Levedura 1 litro de água destilada; Esterilizar o meio por 20 min em autoclave a 1,05 kg/cm². Preparar meio LB sólido adicionando ágar bacteriológico (Acumedia) ao caldo LB, à concentração de 1,5%. Após a esterilização em autoclave, resfriar a mistura a 60°C e derramá-la em placas de petri, deixando estas entreabertas em capela de fluxo laminar até a solidificação do meio.
- **Meio “Infusão Cérebro-Coração” (*Brain Heart Infusion*) e placas BHI ágar:** adicionar 37 g de BHI em pó (HiMedia) a 1 litro de água destilada; após homogeneizar, acertar o pH da mistura para 7,4. Esterilizar o meio por 20 min em autoclave a 1,05 kg/cm². Preparar meio BHI sólido adicionando ágar bacteriológico (Acumedia) e proceder como explicado anteriormente.
- **Salina 0,9%:** dissolver 4,5 g de NaCl em 500 mL de água destilada. Esterilizar a mistura em autoclave por 20 min a 1,05 kg/cm².
- **Tampão de Amostra (5X):** glicerol a 50%, azul de bromofenol a 0,20% e solvente TBE a 2,5X. Estocar a 4°C.
- **TBE 5X (4 litros):** misturar: 216 g de Tris-base; 110 g de ácido bórico; 80 ml de EDTA (0,5 M; pH 8,0); completar com água destilada para 4.000 ml. Homogeneizar e aferir o pH (entre 8,0 e 8,5). Diluir 10X para utilização em eletroforese.

3.5. Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Foram utilizadas duas linhagens para o desenvolvimento desse trabalho. A linhagem *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) foi utilizada para todos os procedimentos de clonagem. Esta linhagem foi cultivada em meio de cultura *Luria-Bertani* (LB), sob agitação ou LB 1,5% ágar. Para ambos os casos a incubação foi feita a 37°C durante 18 horas. Para as linhagens recombinantes foi usado o antibiótico Canamicina adicionado ao meio de cultura na concentração 25µg/mL (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

A linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* 1002, isolada de caprino e cedida pela Universidade Federal da Bahia, foi utilizada para os ensaios de estresse aqui descritos. Esta linhagem foi cultivada sob agitação em *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo ou em placas BHI 1,5% ágar, e incubada a 37°C por 48 horas. Com o intuito de se evitar a formação de grumos em cultivo líquido e permitir o monitoramento do crescimento de *C. pseudotuberculosis* pela leitura de densidade ótica (obtida em espectrofotômetro), adiciona-se ao caldo BHI o tensoativo hidrofílico Tween® 80 à concentração final de 0,05%. O antibiótico Canamicina (25µg/mL) foi adicionado ao meio de cultura para as linhagens recombinantes.

3.6. Técnicas de transformação de DNA

3.6.1. Preparação de células eletrocompetentes e transformação em *E. coli*

Para a preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*, foi feito pré-inóculo da linhagem Top10 em meio LB e a cultura foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, a cultura foi diluída 1/100 em novo meio de cultura LB e incubada a 37°C sob agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado com auxílio de espectrofotômetro (BEL Engineering) até atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) entre 0,2 e 0,4.

Em seguida, a cultura foi resfriada em gelo durante 30 minutos e centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, 4°C. Em seguida, foi repetido por 5 vezes o processo de lavagem das células, no qual os precipitados foram suspensos em glicerol 10% gelado, centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm, 4°C, e mantidas em gelo quando possível. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 1-2 mL de glicerol 10% e alíquotas de 100 µl foram imediatamente congeladas a -80 °C.

Para eletroporação foram adicionados 10-100 ng de DNA plasmidial a uma alíquota descongelada de células eletrocompetentes. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação fria de 0,2 cm (BioRad) e depois eletroporada usando um BioRad GenePulser fixado em capacitância de 25 μ F, 2,5 kVolts e 200 Ω . Após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de caldo LB às células e a suspensão bacteriana foi incubada durante 1 hora a 37 ° C. Alíquotas das células foram então plaqueadas em agar LB contendo Canamicina (25 μ g/mL) (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

3.6.2. Preparação de células eletrocompetentes e transformação em *C. pseudotuberculosis*

Para preparação de células eletrocompetentes de *C. pseudotuberculosis*, foi realizado pré-inóculo em meio de cultura BHI e, então, diluição (1:50) em meio de cultura fresco, o qual foi mantido a 37°C sob agitação até atingir a $DO_{600nm} = 0,4$.

Em seguida, a cultura foi resfriada em gelo durante 30 minutos e centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, 4°C. Em seguida, foi repetido por 5 vezes o processo de lavagem das células, no qual os precipitados foram suspensos em glicerol 10% gelado, centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm, 4°C, e mantidas em gelo quando possível. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 1-2 mL de glicerol 10% e alíquotas de 100 μ l foram imediatamente congeladas a -80 °C.

Para eletroporação foi utilizado o protocolo descrito por Dorella *et al* (2006), sendo adicionados 1 μ g de DNA plasmidial a uma alíquota descongelada de células eletrocompetentes. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação fria de 0,2 cm (BioRad) e depois eletroporada usando um BioRad GenePulser fixado em capacitância de 25 μ F, 2,5 kVolts e 400 Ω . Após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de caldo BHI às células e a suspensão bacteriana foi incubada com agitação durante 1 hora a 37 ° C. Alíquotas das células foram então plaqueadas em ágar BHI contendo Canamicina (25 μ g/mL).

3.7. Manipulação de DNA

3.7.1. Amplificação de DNA por PCR (*Polymerase chain reaction*)

Q5 High-Fidelity NEB

Para amplificação dos fragmentos de DNA a serem clonados, foi utilizada a DNA polimerase de alta fidelidade Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 5 µL do tampão de amplificação 5X Q5, 0,5 µL de dNTP 10 µM, 1,25 µL do primer *forward* (F) e 1,25 µL do primer *reverse* (R), ambos na concentração de 100pmol/µL, 1 µL (20 ng/ µL) de amostra de DNA, 0,25 µL da enzima DNA polimerase Q5 High-Fidelity 2,0 U/µL (NEB) e 15,75 µL de água ultrapura estéril. Para controle negativo da reação, foi adicionada água ultrapura estéril ao invés de DNA.

Ludwig Biotec

Para amplificações de fragmentos de DNA para confirmações de linhagens recombinantes, foi utilizada a Taq polimerase Ludwig (Biotec, Brasil). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 2,5 µL do tampão de amplificação 10X Ludwig, 0,5 µL de dNTP 10 µM, 1,25 µL do primer *forward* (F) e 1,25 µL do primer *reverse* (R), ambos na concentração de 100pmol/µL, 1 µL (20 ng/ µL) de amostra de DNA ou colônia bacteriana adicionada diretamente à reação, 0,125 µL da enzima DNA polimerase Ludwig 5,0 U/µL (Biotec, Brasil) e água ultrapura estéril para completar o volume de 25 µL. Para controle negativo da reação, foi adicionada água ultrapura estéril ao invés de DNA.

As amplificações foram realizadas em um aparelho termociclador (MyGene Series Peltier Thermal Cycler MG96+), sob as condições apresentadas na Tabela 3.1. Ao final da reação de PCR, o produto da reação foi resolvido em gel de agarose a 1% para visualização e a banda de DNA de interesse foi purificada quando necessário.

Tabela 3.1 Condições de amplificação de DNA por PCR

Ciclos	Passo	Q5 High-Fidelity		Ludwig	
		Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
1 ciclo	Desnaturação Inicial	98°C	30''	94°C	5'
	Desnaturação	98°C	10''	94°C	10''
30 ciclos	Anelamento	55-60°C	30''	55-60°C	30''
	Extensão	72°C	1'20''	72°C	1'20''
1 ciclo	Extensão final	72°C	2'	72°C	7'
∞	Armazenamento	4°C	Até uso	4°C	Até uso

3.7.2. Digestão enzimática

Em geral, as reações de digestão foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se entre 1-2 unidades de enzima para 1 µg de plasmídeo, em reações de volume final de 10 µl. As reações foram incubadas a 37°C durante 1-2 horas, e as enzimas inativadas a 65°C por 20 minutos quando necessário.

Digestão Parcial

Quando necessário, foi realizada digestão parcial dos fragmentos, ou seja, digestão incompleta dos sítios de enzima, necessária para posterior visualização de fragmentos específicos. Para isso utilizou-se entre 1-2 unidades de enzima para 1 µg de plasmídeo, em reações de volume final de 10 µl. As reações foram incubadas a 16°C durante 15 minutos, e as enzimas inativadas a 65°C por 20 minutos.

Digestão in silico

Análises de digestões *in silico* das sequências de DNA foram realizadas com auxílio do programa NEBcutter V2.0 (NEB, disponível em <http://nc2.neb.com/NEBcutter2>).

3.7.3. Resolução eletroforética em gel de agarose 1%

A técnica de eletroforese em gel de agarose foi utilizada para separar fragmentos de DNA e permitir a visualização do peso molecular e da quantidade dos plasmídios e produtos de PCR. O gel foi feito com 1% de Agarose dissolvida em TBE 0,5X (45mM Tris, 45mM ácido bórico e 1mM EDTA) e adição de 3,5µl/100mL de brometo de etídio para visualização do DNA sob luz UV. Tampão de amostra 5X foi adicionado às amostras e padrão molecular adequado foi aplicado em conjunto com as amostras para permitir a estimativa do peso molecular dos fragmentos (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). A eletroforese foi conduzida durante 40-50 minutos a 100V em aparelho de eletroforese (GSR 200STD Power Supply), e o DNA foi visualizado em Transluminador UV (DNR Transilluminator 101-0-00). As imagens foram capturadas utilizando câmera de celular.

3.7.4. Purificação de DNA a partir de gel de agarose

Após eletroforese em gel de agarose, as bandas dos fragmentos de DNA de interesse foram visualizadas em Transluminador UV e foram excisadas com ajuda de lâmina bisturi estéril. A purificação foi feita utilizando o Kit Gel Purification System segundo as especificações do fabricante (Qiagen).

3.7.5. Ligações de fragmentos de DNA a partir da enzima T4 DNA ligase

Em geral, as ligações foram realizadas com 10-100 ng DNA plasmidial com proporções entre 1:3 e 1:10 de inserto, de acordo com as recomendações do fabricante (T4 DNA Ligase NEB) num volume de reação de 10 µl. As reações foram incubadas à temperatura ambiente durante 3-4 horas e depois transformadas em *E. coli* ou *C. pseudotuberculosis*.

3.7.6. Extração plasmidial de *E. coli*

Colônias recombinantes confirmadas por PCR foram cultivadas em meio LB líquido à 37°C sob agitação 150 rpm por 16 horas, e a extração plasmidial foi realizada utilizando o Kit Plasmid DNA Purification Kit QIAGEN® de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e quantidade das amostras de DNA plasmidial purificadas foram avaliadas com auxílio do aparelho NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.8. Construção dos plasmídios

3.8.1. Identificação de regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores sigma

Após o sequenciamento do genoma da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, nosso grupo de pesquisa realizou a montagem e anotação do mesmo, que foi depositado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e pode ser acessado pelo número de referência NZ_CP012837.1.

Com a ajuda do programa ARTEMIS®, desenvolvido pelo instituto Sanger, foi possível visualizar as sequências de DNA da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* e sequências de aproximadamente 1000 pb à montante dos genes *sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK* e *sigM* foram analisadas. As regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* foram identificadas com o auxílio do *Software* BPROM (SoftBerry) (SOLOVYEV; SALAMOV, 2011) e selecionadas para posterior clonagem. A Figura 3.1 mostra um exemplo da predição promotora realizada pelo *Software* BPROM. Após a análise da sequência, o programa é capaz de identificar as possíveis sequências consenso -35 e -10, regiões de ligação do fator transcricional e suas respectivas posições em pares de base.

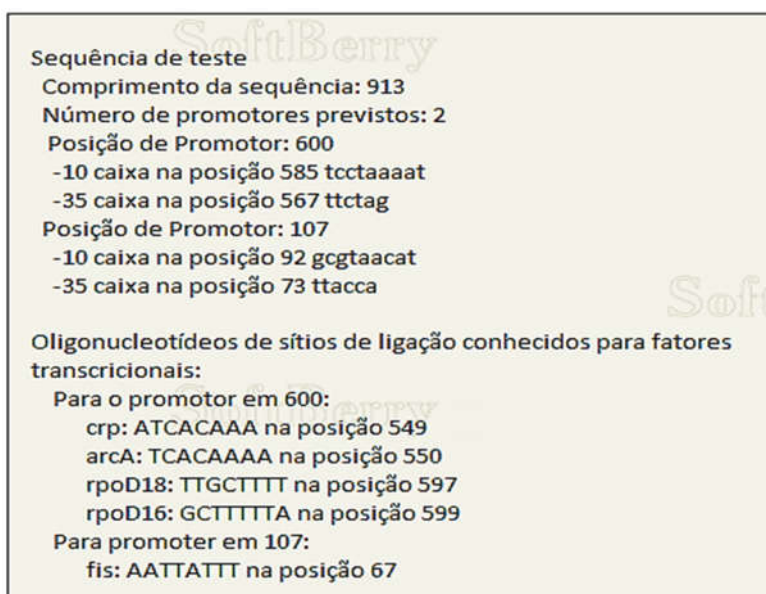


Figura 3.1. Exemplo de análise feita pelo Software BPROM (SoftBerry). Informações sobre o número de promotores previstos, as posições das sequências consenso -35 e -10 e dos possíveis sítios de ligação para fatores transcricionais são fornecidos. Traduzido e adaptado: <http://www.softberry.com>

3.8.2. Oligonucleotídeos confeccionados

Após a predição da região promotora, os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3.2) foram confeccionados baseando-se na sequência da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. A ferramenta de bioinformática Oligo Analyzer v3.1 (Integrated DNA Technologies®) foi utilizada para avaliar as probabilidades de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros. Aproximadamente 1000 pb a montante das sequências dos genes codificadores dos fatores sigma σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M de *C. pseudotuberculosis* foram amplificadas por PCR (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, seus alvos e tamanhos dos produtos amplificados esperados.

Iniciador	Sequência	Alvo	Amplicon
M13_F	5'TGTAAAACGACGGCCAGT-3'	pCR:Blunt	Variável
M13_R	5'- CAGGAAACAGCTATGACC-3'		
sigA_F	5'-AGCATGCTCCGGAATCAAGTAGCACTTTC-3'	<i>sigA</i>	927
sigA_R	5'-AGGATCCGTACGCCCTTTTCGATTGGATG-3'		
sigB_F	5'-AGCATGCCTCACCCCATCGATTCTATGTC-3	<i>sigB</i>	1007
sigB_R	5'-AGGATCCCATGACCTCCTCAAGTCGGCGCTTC-3		
sigC_F	5'-CGGCGCATGCGATATGCCTCGCCTCGCGATGATGGTCGG-3	<i>sigC</i>	948
sigC_R	5'-ATACTCCTGTAAATGAGAGAACTAAGGA CTTTACCACCTAAACTAAAGTTG-3		
sigD_F	5'-AGCATGCACGCTAAGGTCGGCGTCAAC-3'	<i>sigD</i>	1024
sigD_R	5'-AGGATCCTTAGAATCGGACCGTCTAAG-3'		
sigE_F	5'-AGCATGCCAAATTAGTCCCAGTGGCGTGGTTG-3'	<i>sigE</i>	932
sigE_R	5'-AGGATCCGAAAGGTATTTGCCGACTCTTC-3'		
sigH_F	5'-AGCATGCGTGCCGCCTTTGCTTCTCGACGCTG-3	<i>sigH</i>	912
sigH_R	5'-AGGATCCTGATCTCCTTAGAATTGGACTATC-3		
sigK_F	5'-AGCATGCAGAGCAAAAATGAGCAGTGGAAG-3'	<i>sigK</i>	881
sigK_R	5'-AGGATCCTAGAGGTCAGTGCTCCTTATACAAG-3'		
sigM_F	5'-AGCATGCAACCCCGCAACTCCTCGGGCTTTG-3'	<i>sigM</i>	1014
sigM_R	5'-AGGATCCTATTTCCCCCATAGTGTGCGGTG-3'		

3.8.3. Clonagem no pCR-Blunt

Os produtos amplificados por PCR para os promotores dos genes *sigA*, *sigB*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK* e *sigM* foram clonados no plasmídio pCR-Blunt (Figura 3.2A), de acordo com as especificações do Kit de clonagem Zero Blunt® Cloning® pCR™-Blunt (ThermoFisher Scientific), e transformados em células eletrocompetentes de *E. coli* Top10. Para seleção de clones transformantes positivos, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo Canamicina (25µg/µl).

Para confirmação dos transformantes, uma PCR de colônia foi realizada com os *primers* universais M13, que se anelam nas regiões próximas ao sítio múltiplo de clonagem do plasmídio pCR-Blunt, para a detecção dos insertos no plasmídio. Após confirmação, colônias positivas selecionadas foram cultivadas em meio LB líquido contendo Canamicina (25µg/µl) e as culturas foram submetidas à extração plasmidial (Plasmid MiniPrep System - Promega). Os plasmídios extraídos foram digeridos pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Sph*I, e os fragmentos liberados foram visualizados em resolução eletroforética em gel de agarose 1%. A banda correspondente ao fragmento foi excisada e purificada.

3.8.4. Subclonagem no vetor pSM20

Os fragmentos recuperados das construções pCR-Blunt::*P_{sig}* (promotor de fator sigma) foram subclonados no plasmídio *promoterless* pSM20 (Figura 3.2B). Para a clonagem dos fragmentos de cada região promotora nesse vetor, o mesmo foi linearizado pela digestão com as enzimas de restrição, *Bam*HI e *Sph*I, e os insertos subclonados a montante do gene *gfp*. Os plasmídios construídos foram transformados em *E. coli* Top10. Semelhante ao processo de clonagem no pCR-Blunt, os transformantes foram confirmados por PCR de colônia e os plasmídios extraídos confirmados por digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sph*I.

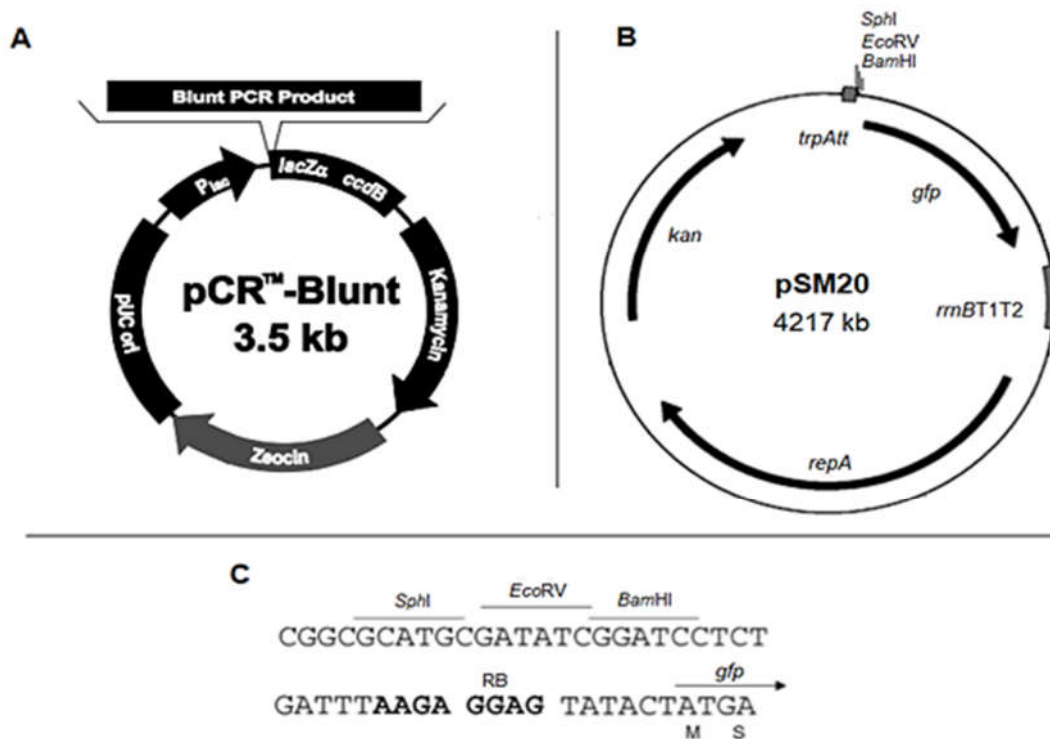


Figura 3.2. Mapas dos vetores plasmidiais utilizados nesse estudo. A- pCR-Blunt: clonagem de produto de PCR bloqueia transcrição do gene letal *ccdB* fusionado ao *lacZα*, permitindo somente o crescimento de recombinantes positivos após transformação. **B-** pSM20: *gfp* codifica a proteína GFP; *repA* necessário para a replicação em *C. pseudotuberculosis* e *E. coli*. Ambos plasmídios possuem o gene de resistência à Canamicina (*kan*). **C-** Sequência de DNA do sítio múltiplo de clonagem (MCS), sítio de ligação ao ribossomo (RB) e início da sequência codificadora do gene *gfp*. Adaptado - Brenda Luz 2018 (UserGuide Zero Blunt® PCR Cloning Kit.; (MCKEAN *et al.*, 2005).

3.8.5. Clonagem com Gibson Assembly

Devido à dificuldade de clonagem da região promotora do gene *sigC* no pCR-Blunt, foi utilizada outra estratégia para realizar a construção pSM20::P_{sigC}. A região promotora desse fator sigma foi amplificada por PCR de acordo com a metodologia *Gibson Assembly*, técnica que permite a junção de múltiplos fragmentos de DNA em uma mesma reação. Para isso, o plasmídio pSM20 foi linearizado por digestão com a enzima *BamHI*, e o fragmento inserido na região desse sítio de restrição (Figura 3.3B). A construção pSM20::P_{sigC} foi transformada em *E. coli* Top10 e a seleção de

transformantes foi realizada através de plaqueamento em meio LB contendo Canamicina 25µg/µl. Os transformantes positivos foram confirmados por PCR e digestão enzimática. As construções obtidas foram sequenciadas e individualmente transferidas para a linhagem *C. pseudotuberculosis* 1002.

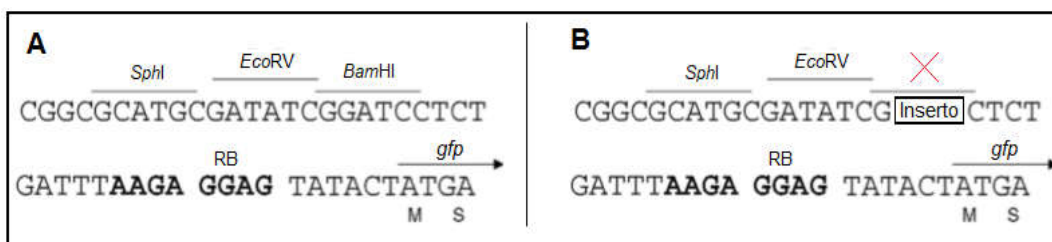


Figura 3.3. Representação esquemática da construção do plasmídeo pSM20::P_{sigC}.

A- Sequência de DNA original do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pSM20 (*promoterless*). **B-** Sequência de DNA da região do sítio múltiplo de clonagem após a inserção da região promotora do gene *sigC* pela metodologia *Gibson Assembly* e consequente perda do sítio para a enzima de restrição *Bam*HI na construção pSM20::P_{sigC}.

3.8.6. Sequenciamento e montagem dos plasmídios

Os plasmídios obtidos foram sequenciados utilizando a tecnologia Illumina HiSeq (Illumina, San diego, CA, USA), a partir de bibliotecas paired-end (2x 150 pb) e fragmento de aproximadamente 450 pb. As sequências de leituras foram inicialmente avaliadas quanto a qualidade utilizando o programa FastQC (ANDREWS, 2010). Após a determinação da cobertura, 10.000 leituras foram amostradas utilizando o programa Seqtk do SeqKit (SHEN et al., 2016). A montagem de cada um dos plasmídeos foi realizada pela ferramenta Unicycler (WICK et al., 2017). Unicycler é um pipeline de montagem *ab initio* (de novo) que utiliza SPAdes como montador para a construção de um grafo De Bruijn testando vários K-mers. Como entrada, o Unicycler recebeu os arquivos das leituras *forward* e *reverse* provenientes da amostragem feita dos dados brutos e o programa foi então executado utilizando os parâmetros padrão. Os mapas genéticos dos plasmídeos foram gerados utilizando o *Software SnapGene* (GSL Biotech, disponível em <http://www.snapgene.com/>).

3.9. Avaliação da ativação diferencial de promotores de fatores sigma em *C. pseudotuberculosis* por citometria de fluxo

3.9.1. Citometria de fluxo

Citometria de fluxo é uma técnica capaz de mensurar diversos parâmetros de populações celulares ou mesmo partículas não biológicas em um sistema de detectores fotônicos (Sayes, 2016). O aparelho permite a análise de propriedades físicas e/ou químicas da partícula através do emprego de radiação laser, óptica, fluxo hidrodinâmico e substâncias fluorescentes (BADGER et al., 2011). Ao ser injetada no citômetro, a amostra em solução passa por um capilar capaz de ordenar a passagem das moléculas de modo que apenas uma, por vez, seja interceptada por um laser. A emissão de luz gerada a partir da excitação da partícula pelo laser fornece informações sobre as propriedades da molécula (Rahman, 2006).

O parâmetro *Side Scatter* (SSC) fornece informações sobre a granulosidade (complexidade) da partícula, e o parâmetro *Forward Scatter* (FSC) sobre o tamanho. Os aparelhos de citometria podem analisar de quatro até quatorze cores simultaneamente, a depender de sua configuração. Atualmente, os fotorreceptores de fluorescência mais comuns presentes nos aparelhos são os FL-1, FL-2 e FL-3 que detectam a fluorescência das partículas nos comprimentos de onda emitidos pelos fluorocromos FITC (verde), PE (laranja) e Cy5 (vermelho), respectivamente. A velocidade, alta precisão e alta resolução da tecnologia permite que dados qualitativos e quantitativos sejam extraídos de amostras de forma eficiente (Sayes, 2016). Dessa forma, essa técnica apresenta uma ampla gama de aplicações tecnológicas e médicas, que incluem estudos imunológicos, análises de expressão gênica, diagnósticos de doenças, entre outras (Badger, 2011; Sayes, 2016).

A proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) tem sido amplamente utilizada na comunidade científica como gene repórter para o estudo da regulação gênica através de citometria de fluxo. Estudos abordando Indução Diferencial de Fluorescência (IDF) para a detecção de genes diferencialmente expressos já foram realizados para bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (BARKER; BROOKS; SMALL, 1998; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007, 2005; VALDIVIA; FALKOW, 1996).

3.9.2. Preparação das amostras

Após a construção dos plasmídios, eles foram, individualmente, transformados na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. A linhagem 1002 foi, rotineiramente, cultivada em caldo BHI ou BHI 1,5% ágar, a 37°C, por 48h, acrescida de Canamicina 25µg/mL para as linhagens recombinantes. Para a aplicação dos estresses *in vitro*, foi feito pré-inóculo de cada linhagem contendo seu respectivo plasmídio (1002 pSM20 *promoterless* ou pSM20::P_{sig}) em caldo BHI a 37°C entre 12-16h. Após o crescimento, foi feito novo inóculo em caldo fresco, sendo o crescimento bacteriano monitorado até a cultura atingir a DO_{600nm} = 0,2. Nesse ponto, a cultura foi dividida em 4 réplicas experimentais as quais foram, individualmente, submetidas por 15 minutos aos estresses descritos na Tabela 3.3 para a avaliação da indução da produção da proteína GFP (Figura 3.4).

Tabela 3.3 Condições de estresse aplicadas nos ensaios *in vitro*.

Estresse	Método	Condição
Estresse oxidativo	Meio BHI acrescido de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	5mM
		10mM
Estresse osmótico	Meio BHI acrescido de NaCl (cloreto de sódio)	0,5M
		2M
Estresse de superfície celular	Meio BHI acrescido de SDS (dodecil sulfato de sódio)	0,01%
		0,05%
	Meio BHI acrescido de lisozima	500 µg/mL 1 mg/mL

3.9.3. Parâmetros utilizados

Após a aplicação do estresse, as amostras foram centrifugadas e suspendidas em salina 0,9%. Em seguida foi feita a leitura de 30.000 eventos das amostras em citômetro BD Accuri™ C6. Os dados gerados pelo aparelho foram analisados no *Software* FlowJo V10 (FlowJo®) e as informações sobre a frequência populacional e intensidade média de fluorescência (IMF) foram extraídas (Figura 3.5).

3.9.4. Análises

Para analisar estatisticamente a intensidade média de fluorescência (IMF) e a frequência populacional das amostras foi usado o teste estatístico One-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas no programa GraphPad Prism versão 6. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos de acordo com o valor de p: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

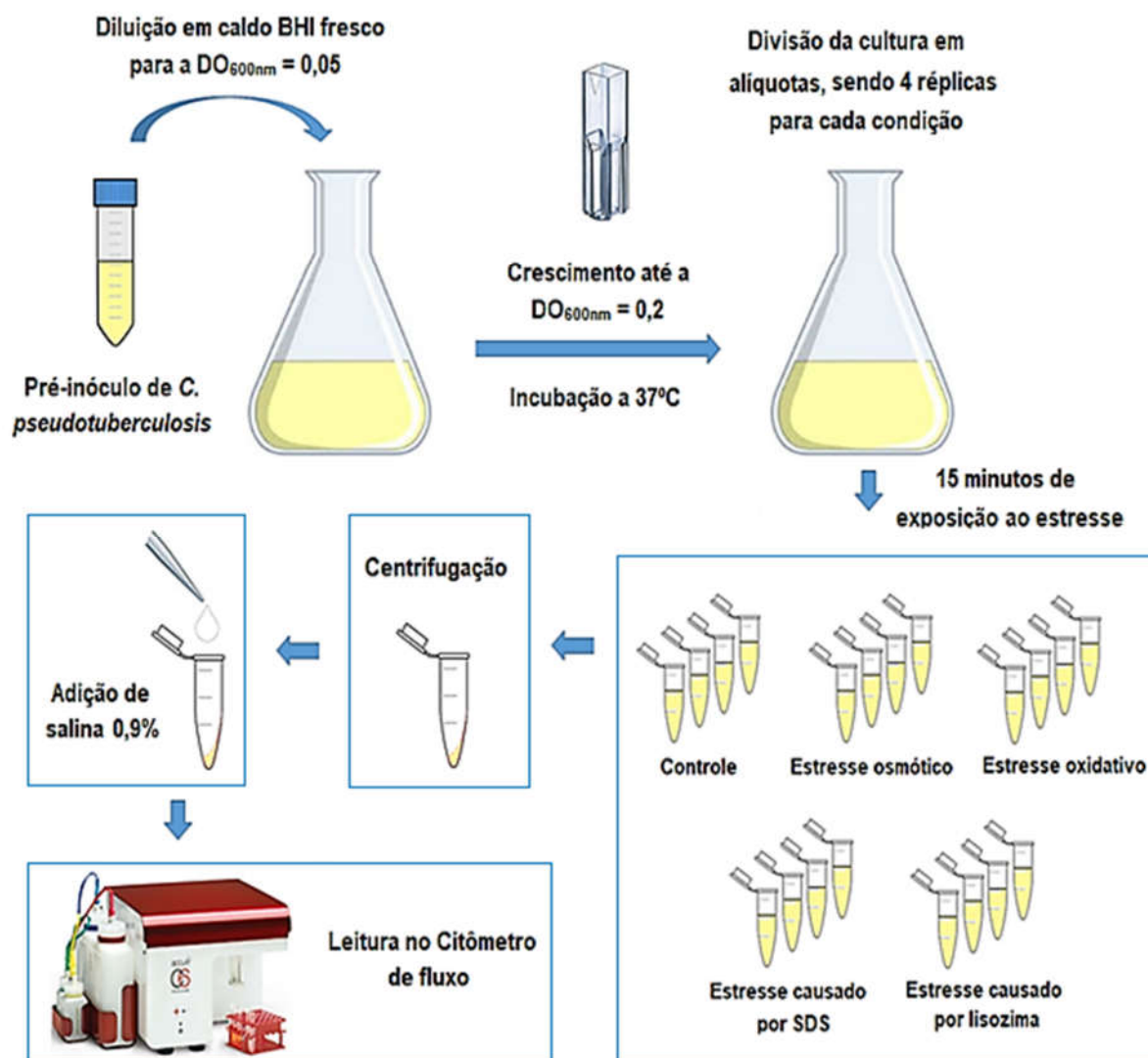


Figura 3.4. Representação esquemática dos experimentos realizados para avaliação da indução diferencial de fluorescência pelas regiões promotoras do genes codificadores de fatores sigma de *C. pseudotuberculosis*. Após diluição do pré-inóculo, a DO_{600nm} da cultura foi regularmente monitorada com auxílio de espectrofotômetro até atingir 0,2. Nesse momento, a cultura foi dividida em várias alíquotas, sendo 4 para o controle e 4 para cada estresse, nas quais foram adicionadas as quantidades necessárias de cada agente causador de estresse. Após 15 minutos de exposição ao estresse as amostras foram centrifugadas e o *pellet* suspenso em salina 0,9% para leitura no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6.

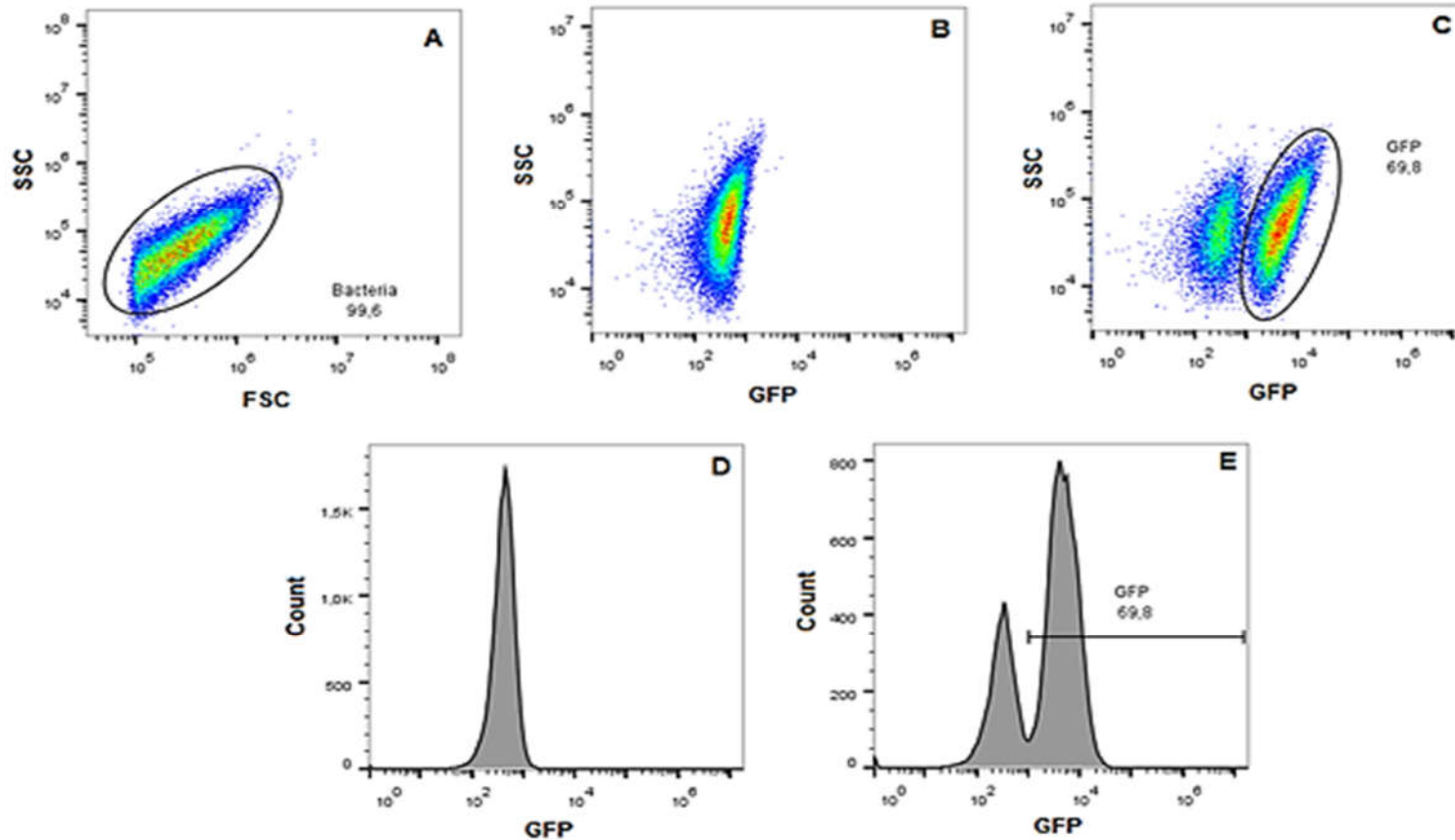


Figura 3.5. Representação esquemática da estratégia utilizada para análise dos resultados de citometria de fluxo no Software FlowJo. Foram construídos gráficos de densidade de granulidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) para selecionar a população de interesse através de uma janela -“gate” (A). Construindo-se gráficos de densidade de fluorescência GFP *versus* SSC foi possível avaliar população de bactéria sem a produção de GFP (B) e com produção de GFP (C). As figuras D e E representam, em gráfico de histograma, a intensidade média de fluorescência das populações sem e com produção de GFP, respectivamente.

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes

4.1.1. Identificação das regiões promotoras

Os procariotos são capazes de expressar seus genes de modo dinâmico, sintetizando produtos na quantidade e no momento adequado para a manutenção da homeostase celular (BROWNING; BUSBY, 2004). A transcrição bacteriana depende da ligação da holoenzima da RNAP ao DNA e, neste processo, o fator sigma atua como uma subunidade responsável pelo reconhecimento da região promotora específica para o início da transcrição gênica (PAGET; HELMANN, 2003).

Devido à grande quantidade de material genético presente no genoma, existe uma competição entre diferentes promotores pela ligação à RNAP. Por isso, componentes moleculares como os fatores transcricionais e a sequência do DNA permitem a regulação apropriada do início da transcrição de cada gene ((BROWNING; BUSBY, 2004). O reconhecimento do promotor pela RNAP baseia-se em diferentes elementos estruturais do DNA, sendo os principais as sequências consenso -35 e -10, as quais estão localizadas a montante do sítio de início de transcrição do referido gene (FEKLÍSTOV et al., 2014).

Os fatores sigma são amplamente distribuídos entre as bactérias, que podem ter apenas um fator sigma primário, essencial para o metabolismo celular, até dezenas de fatores sigma alternativos, sendo cada fator transcricional direcionado para a expressão de um conjunto específico de genes (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005; PAGET; HELMANN, 2003). A regulação da expressão de fatores sigma pode ser complexa, ocorrendo em nível de transcrição, tradução e pós-tradução (DONÀ et al., 2008). Em alguns casos, a expressão de um fator sigma pode ser ativada pelo reconhecimento de sua região promotora por outro fator sigma, ou pela presença de um fator anti-sigma, capaz de sequestrar o fator sigma cognato impedindo sua interação com a RNAP até que sua função na célula seja requerida (BROWNING; BUSBY, 2004; HUGHES; MATHEE, 1998).

Como diferentes fatores sigma reconhecem sequências promotoras de conjuntos distintos de genes, existem diferentes mecanismos de ativação e regulação destes reguladores transcricionais, a depender da necessidade da célula. Em *M. tuberculosis*, por exemplo, foram identificadas três regiões promotoras pelas quais o gene *sigE* pode ser transcrito a depender do estímulo ambiental, podendo ser ativado por um sistema de dois-componentes em resposta aos estresses de superfície celular e de pH alcalino, ou pelo fator σ^H , em resposta aos estresses oxidativo e térmico (DONÀ

et al., 2008). Além disso, diferentes sítios de iniciação presentes no mRNA podem resultar em isoformas variadas do fator σ^E após a tradução (DONÀ et al., 2008).

Neste trabalho, foi utilizada a ferramenta de bioinformática *SoftBerry* – BPROM para identificar as possíveis regiões promotoras presentes nas sequências de aproximadamente 1000 pb localizadas a montante dos genes codificadores dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis*. A partir da predição feita pelo *software* foram identificados 2 possíveis promotores para os genes codificadores dos fatores σ^A , σ^E e σ^K , enquanto 3 possíveis promotores foram identificados para os genes codificadores dos fatores σ^B , σ^C , σ^D , σ^H e σ^M (Figuras 4.1 e 4.2). Esses resultados sugerem que a transcrição dos genes codificadores de fatores σ em *C. pseudotuberculosis* é controlada por vários promotores, os quais estão provavelmente envolvidos em uma complexa rede de regulação.

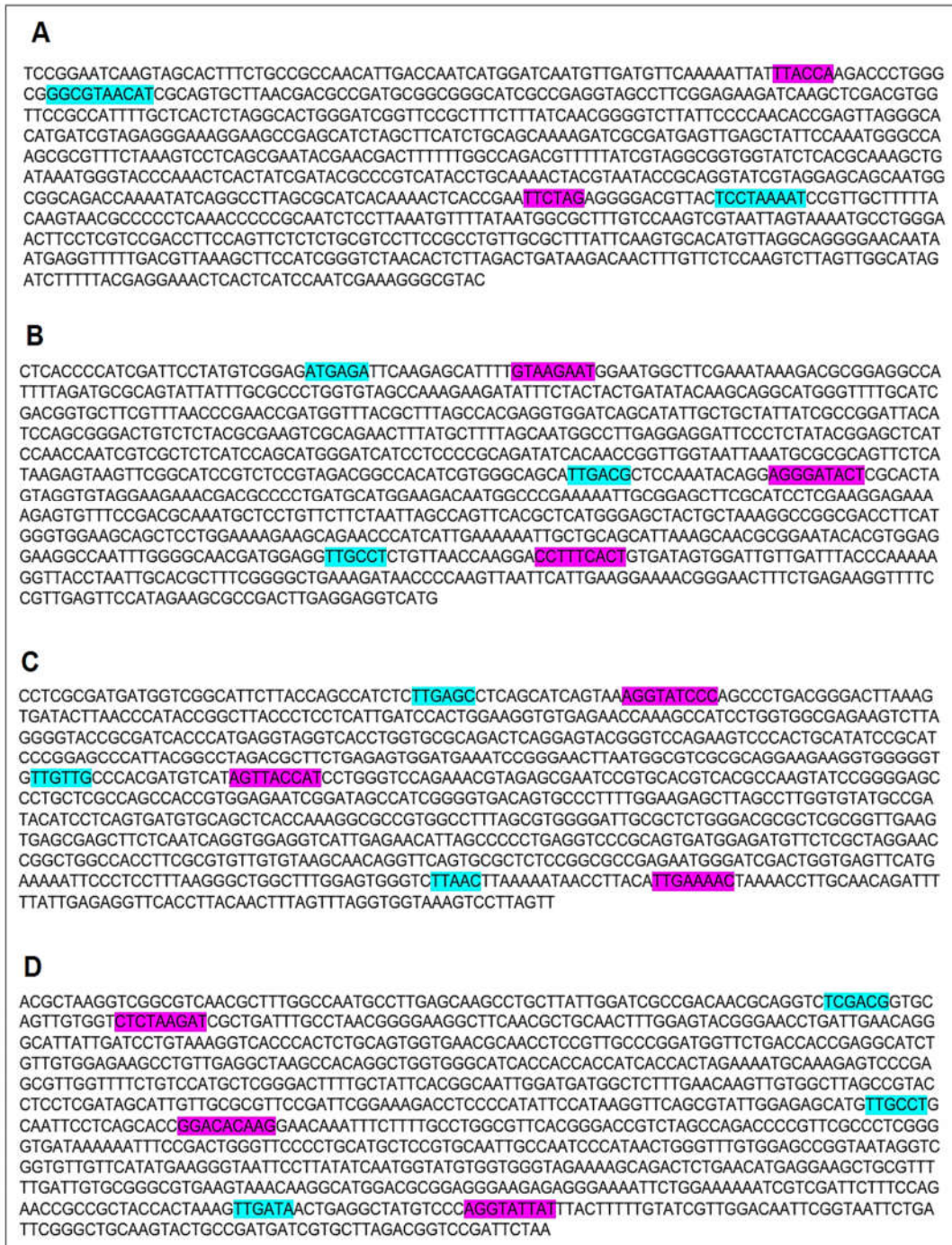


Figura 4.1. Predição das regiões promotoras de genes codificadores de fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* numa região de aproximadamente 1000 pb à montante da ORF dos genes. Regiões identificadas com o auxílio da ferramenta de bioinformática *SoftBerry* – BPRM. As regiões consenso -35 e -10 estão destacadas em azul e rosa, respectivamente. A- Região promotora do gene *sigA*; B- Região promotora do gene *sigB*; C- Região promotora do gene *sigC*; D- Região promotora do gene *sigD*.

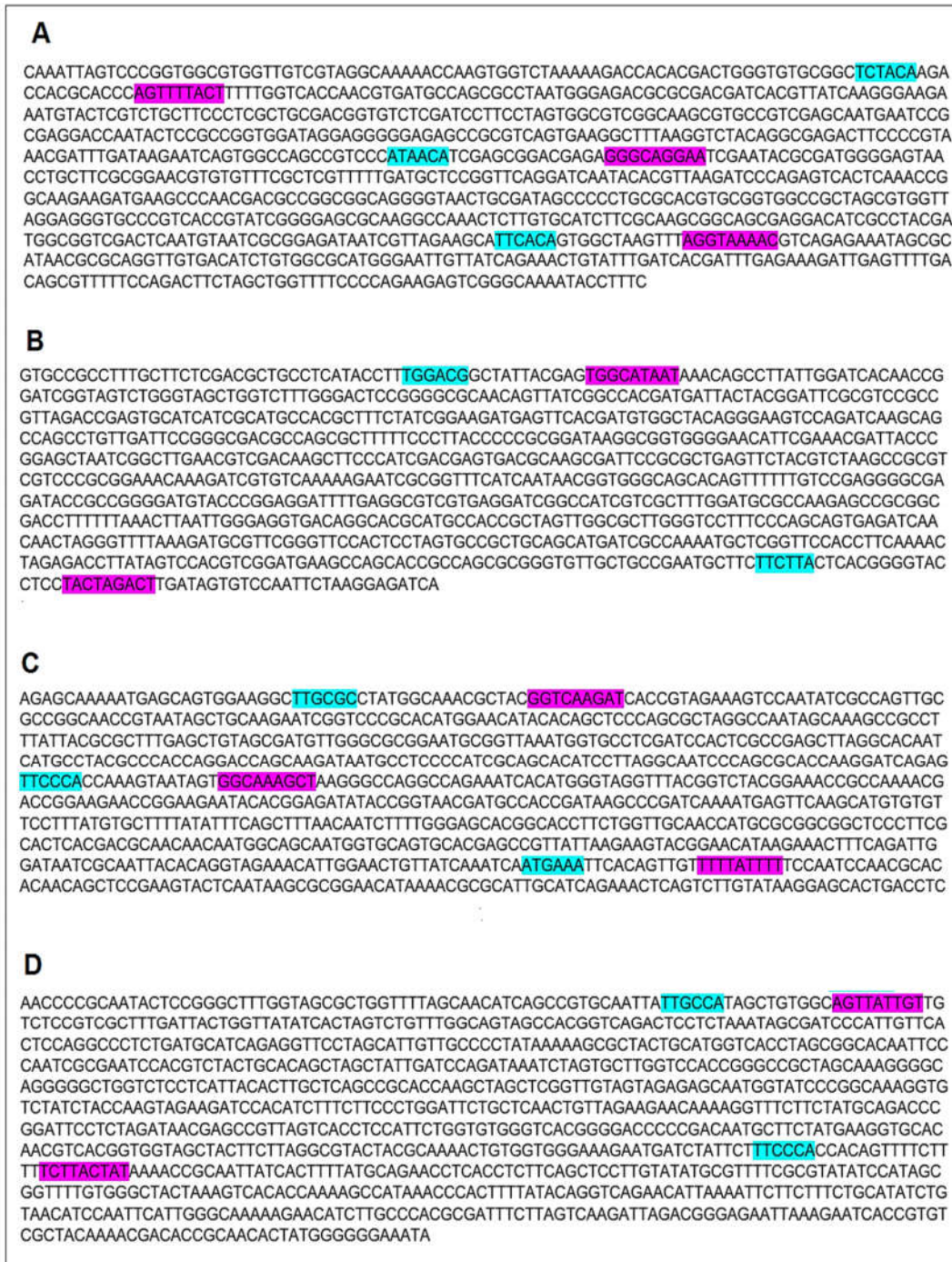


Figura 4.2. Predição das possíveis regiões promotoras de genes codificadores de fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* numa região de aproximadamente 1000 pb à montante da ORF dos genes. Regiões identificadas com o auxílio da ferramenta de bioinformática *SoftBerry* – BPRM. As regiões consenso -35 e -10 estão destacadas em azul e rosa, respectivamente. A- Região promotora do gene *sigE*; B- Região promotora do gene *sigH*; C- Região promotora do gene *sigK*; D- Região promotora do gene *sigM*.

4.1.2. Clonagens no vetor pCR-Blunt

Os fragmentos englobando as regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores σ^A , σ^B , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K , e σ^M de *C. pseudotuberculosis* foram amplificados com sucesso por PCR, utilizando DNA genômico da linhagem 1002 como molde. Na visualização por eletroforese representada na Figura 4.3, podemos observar bandas no tamanho de, aproximadamente, 1000 pb, demonstrando a amplificação da região promotora dos genes *sigA*, *sigB*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK* e *sigM*.

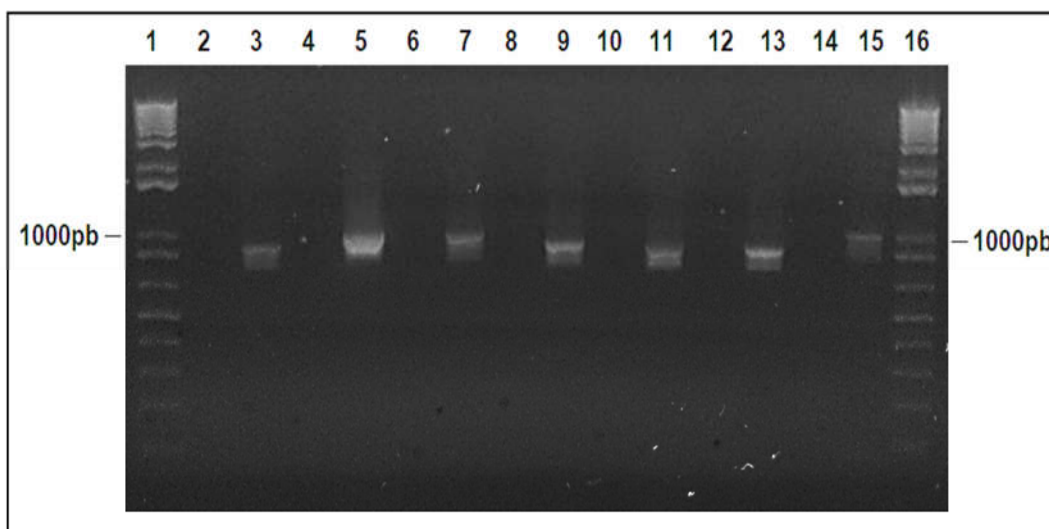


Figura 4.3. Resolução eletroforética dos produtos de PCR obtidos com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. As bandas amplificadas apresentam o tamanho esperado de aproximadamente 1000pb. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação do *sigA*; Canaleta 3: Região promotora do *sigA*; Canaleta 4: Controle negativo da reação do *sigB*; Canaleta 5: Região promotora do *sigB*; Canaleta 6: Controle negativo da reação do *sigD*; Canaleta 7: Região promotora do *sigD*; Canaleta 8: Controle negativo da reação do *sigE*; Canaleta 9: Região promotora do *sigE*; Canaleta 10: Controle negativo da reação do *sigH*; Canaleta 11: Região promotora do *sigH*; Canaleta 12: Controle negativo da reação do *sigK*; Canaleta 13: Região promotora do *sigK*; Canaleta 14: Controle negativo da reação do *sigM*; Canaleta 15: Região promotora do *sigM*; Canaleta 16: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Análises *in silico* realizadas com o auxílio do Software ARTEMIS® permitiram a visualização das regiões promotoras que foram amplificadas por PCR, e suas respectivas regiões flanqueadoras no genoma da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* (Figuras 4.4 e 4.5).

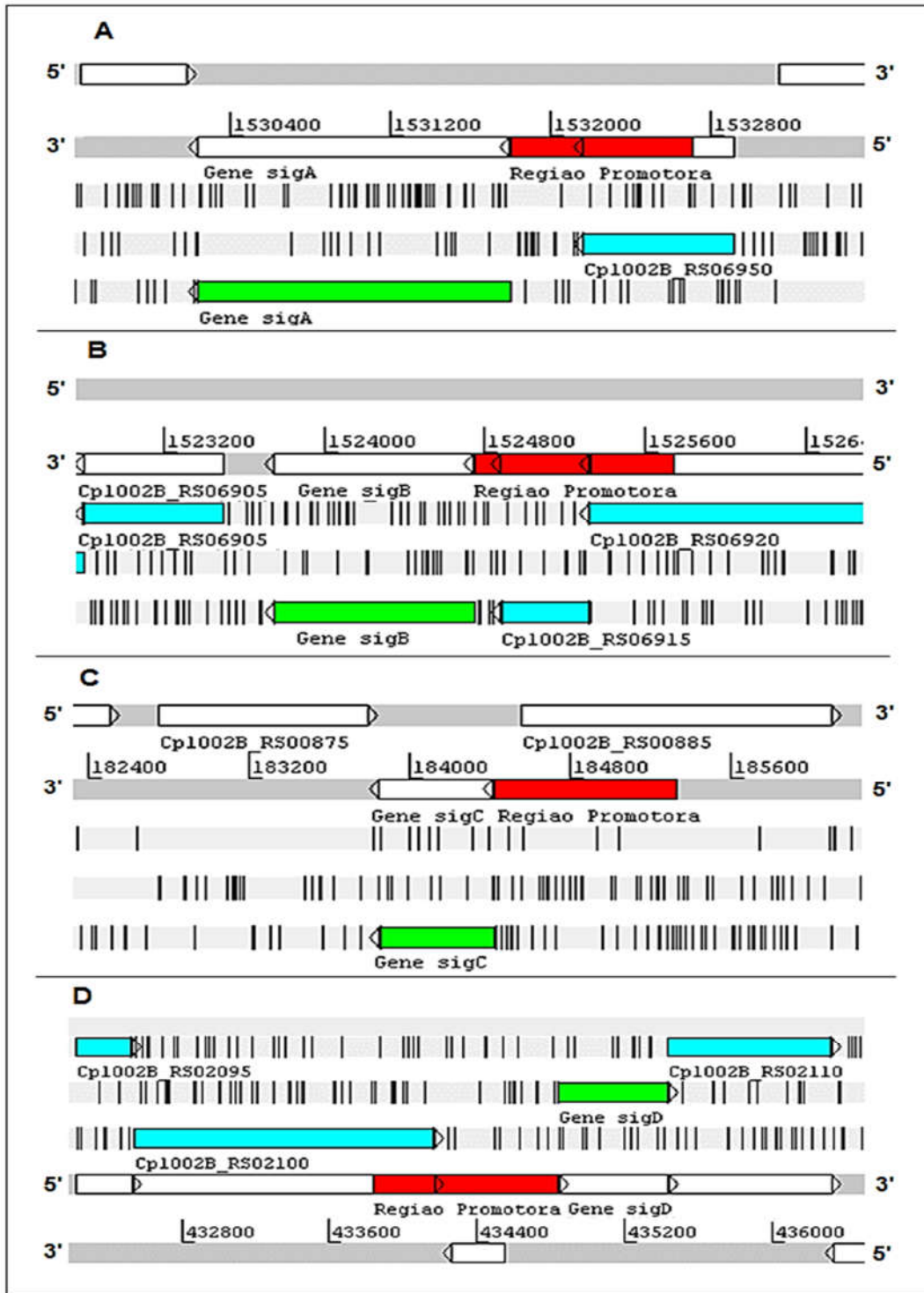


Figura 4.4. Regiões promotoras amplificadas e suas respectivas regiões flanqueadoras no genoma de *C. pseudotuberculosis*. A – Região promotora do gene *sigA*; B – Região promotora do gene *sigB*; C – Região promotora do gene *sigC*; D – Região promotora do gene *sigD*; Região promotora: vermelho; Gene codificador de fator σ : verde; Outros genes: azul.

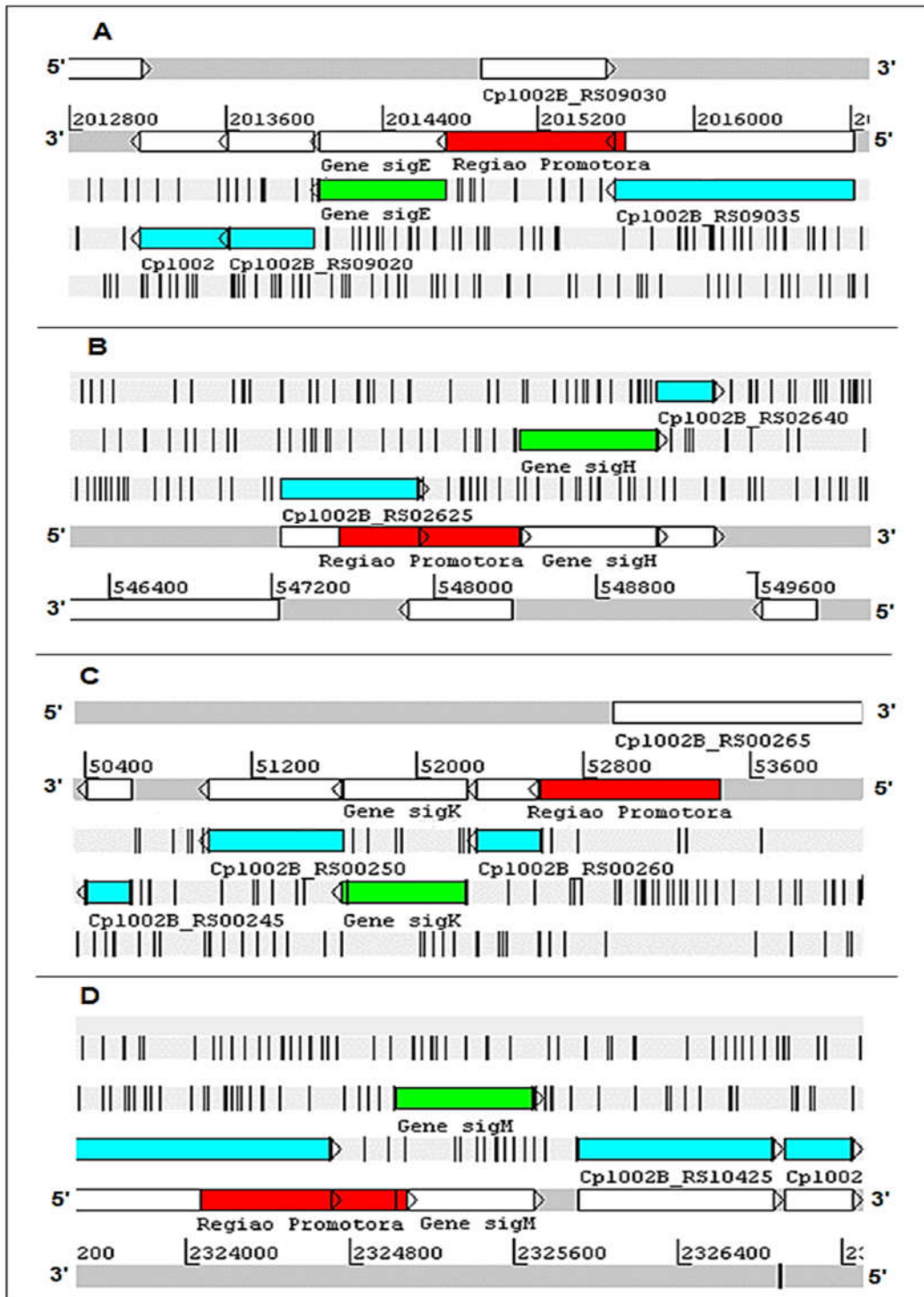


Figura 4.5. Regiões promotoras amplificadas e suas respectivas regiões flangeadoras no genoma de *C. pseudotuberculosis*. A – Região promotora do gene *sigE*; B – Região promotora do gene *sigH*; C – Região promotora do gene *sigK*; D – Região promotora do gene *sigM*; Região promotora: vermelho; Gene codificador de fator σ : verde; Outros genes: azul.

Após a amplificação dos fragmentos por PCR e purificação das bandas correspondentes, foi realizada a ligação dos fragmentos no plasmídio pCR-Blunt e posteriormente a transformação em *E. coli* Top10 (Invitrogen). Os recombinantes positivos foram selecionados com sucesso por PCR de colônia, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que se anelam às sequências do fago M13 presentes nesse plasmídio.

Uma colônia de cada construção foi selecionada e cultivada em meio LB para posterior purificação de DNA plasmidial (3.7.6). Na Figura 4.6 podemos observar as bandas amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores M13 no tamanho de, aproximadamente, 1000 pb para as construções pCR-Blunt::*P_{sigA}*, pCR-Blunt::*P_{sigB}*, pCR-Blunt::*P_{sigD}*, pCR-Blunt::*P_{sigE}*, pCR-Blunt::*P_{sigH}*, pCR-Blunt::*P_{sigK}*, e pCR-Blunt::*P_{sigM}*.

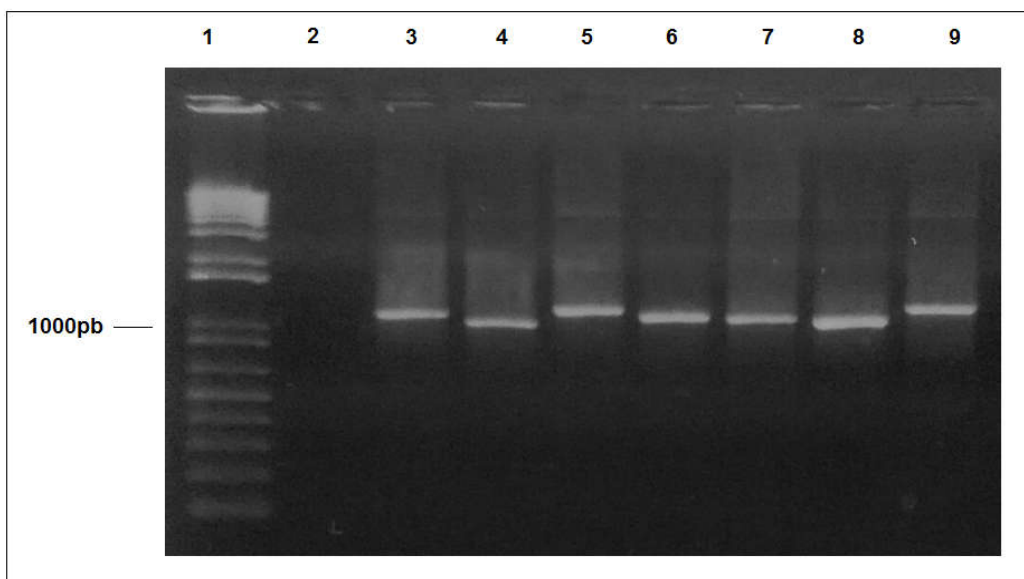


Figura 4.6. Resolução eletroforética mostrando fragmentos de DNA gerados por PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores complementares às sequências do fago M13 presentes nas construções pCR-Blunt::*P_{sig}*, para confirmação das clonagens. As bandas amplificadas apresentam tamanhos esperados de aproximadamente 1000pb. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: pCR-Blunt: *P_{sigA}*; Canaleta 4: pCR-Blunt: *P_{sigB}*; Canaleta 5: pCR-Blunt: *P_{sigD}*; Canaleta 6: pCR-Blunt: *P_{sigE}*; Canaleta 7: pCR-Blunt: *P_{sigH}*; Canaleta 8: pCR-Blunt: *P_{sigK}*; Canaleta 9: pCR-Blunt: *P_{sigM}*.

4.1.2.1. Digestões com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I

Após a confirmação por PCR das construções baseadas no plasmídio pCR-Blunt contendo as regiões promotoras dos genes σ^A , σ^B , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K , e σ^M , foram realizadas digestões dos insertos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I, para subclonagens no vetor pSM20.

A resolução eletroforética (Figura 4.7) dos produtos das digestões revelou a presença de bandas de aproximadamente 1000 pb para as construções pCR-Blunt::*P*_{sigA}, pCR-Blunt::*P*_{sigB}, pCR-Blunt::*P*_{sigE}, pCR-Blunt::*P*_{sigK}, e pCR-Blunt::*P*_{sigM}, e outras duas bandas nos tamanhos de 2042 pb e 1385 pb, respectivamente, após digestão completa (3.7.2) com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I. A banda de aproximadamente 1000 pb confirma a liberação do fragmento correspondente à região promotora de fator sigma clonada, enquanto as outras duas bandas visualizadas resultam da digestão de um segundo sítio para a endonuclease de restrição *Sph*I, presente dentro do gene *kan* do plasmídio pCR-Blunt, que possui 3500 pb. Os fragmentos dos tamanhos de aproximadamente 1000 pb correspondentes a cada região promotora foram isolados e purificados para posterior clonagem no plasmídio pSM20 (3.7.4).

Análises *in silico* confirmaram a presença de um sítio da endonuclease de restrição *Sph*I na região promotora do gene *sigD* e dois sítios da mesma endonuclease de restrição na região promotora do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis*. Para clonar as regiões promotoras dos genes *sigD* e *sigH* no vetor pSM20, foram realizadas digestões enzimáticas parciais (3.7.2) das construções pCR-Blunt::*P*_{sigD} e pCR-Blunt::*P*_{sigH} para que os fragmentos correspondentes pudessem ser recuperados de forma íntegra. Como consequência dessa digestão parcial, diversas bandas correspondentes a fragmentos de diferentes tamanhos foram visualizadas após a resolução eletroforética (Figura 4.7). Os fragmentos completos dos tamanhos esperados de 1024 pb e 912 pb correspondente às regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores σ^D e σ^H , respectivamente, foram isolados e purificados para posterior clonagem no plasmídio pSM20.

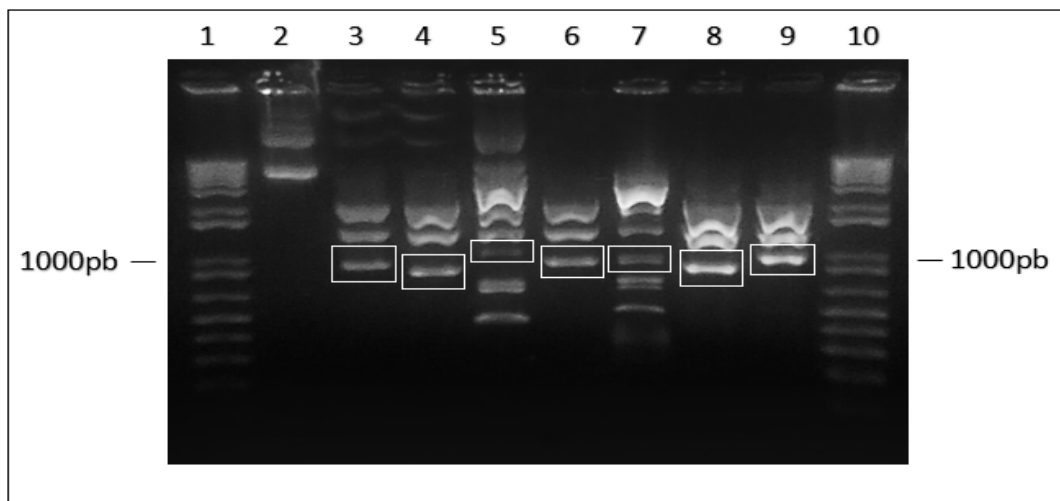


Figura 4.7. Resolução eletroforética dos produtos das reações de digestão realizadas utilizando diferentes construções pCR-Blunt::*P_{sig}* e endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo (plasmídeo não digerido); Canaleta 3: pCR-Blunt: *P_{sigA}*; Canaleta 4: pCR-Blunt: *P_{sigB}*; Canaleta 5: pCR-Blunt: *P_{sigD}*; Canaleta 6: pCR-Blunt: *P_{sigE}*; Canaleta 7: pCR-Blunt: *P_{sigH}*; Canaleta 8: pCR-Blunt: *P_{sigK}*; Canaleta 9: pCR-Blunt: *P_{sigM}* e Canaleta 10: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os retângulos destacam os fragmentos de aproximadamente 1000pb liberados após as digestões. As construções pCR-Blunt: *P_{sigD}* (5) e pCR-Blunt: *P_{sigH}* (7) possuem sítio adicional para a enzima de restrição *Sph*I na região promotora.

Na Figura 4.8 podemos observar digestão *in silico* realizada com o *Software* NEBcutter V2.0 (3.7.2) e também a digestão completa (3.7.2) das construções pCR-Blunt::*P_{sigD}* e pCR-Blunt::*P_{sigH}*, confirmando a presença dos sítios extras da endonuclease de restrição *Sph*I nas regiões promotoras dos genes *sigD* e *sigH*. Ambas digestões realizadas com a construção pCR-Blunt::*P_{sigA}* foram utilizadas como controle positivo para fins de comparação.

A Figura 4.9 representa, de forma geral, o mapa genético das construções pCR-Blunt::*P_{sigA}*, pCR-Blunt::*P_{sigB}*, pCR-Blunt::*P_{sigE}*, pCR-Blunt::*P_{sigK}*, e pCR-Blunt::*P_{sigM}*, e a Figura 4.10 mostra o mapa genético das construções pCR-Blunt::*P_{sigD}* e pCR-Blunt::*P_{sigH}*, incluindo os sítios reconhecidos pelas endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I e suas posições dentro do plasmídeo.

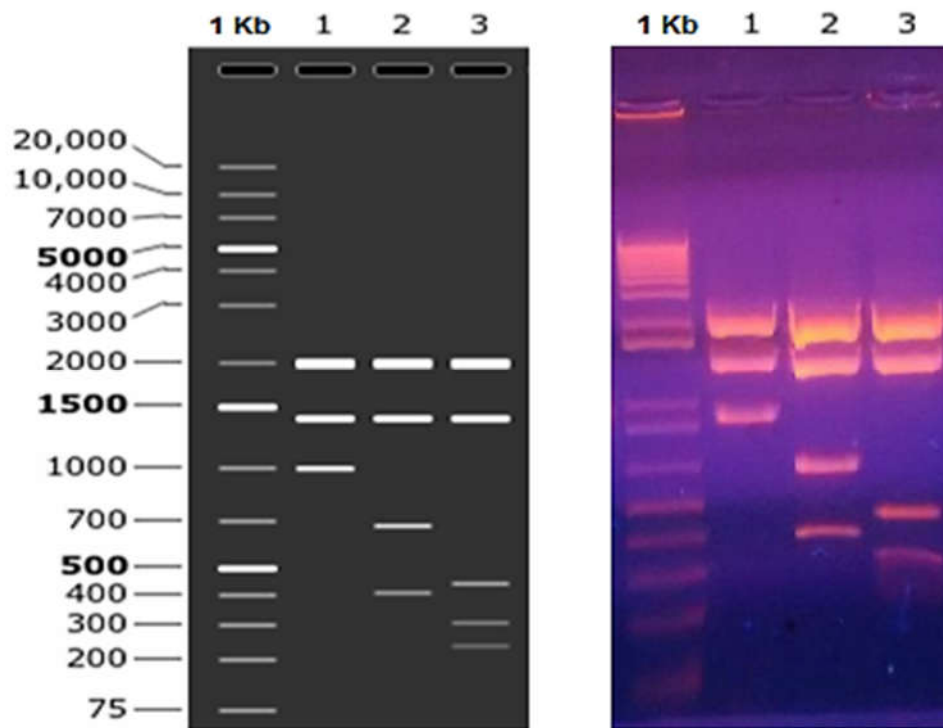


Figura 4.8 Digestões realizadas com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I.

A- Digestão *in silico*: Canaleta 1 - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Canaleta 2 - pCR-Blunt::*P_{sigA}*; Canaleta 3 - pCR-Blunt::*P_{sigD}*; Canaleta 4 - pCR-Blunt::*P_{sigH}*. B- Digestão completa: Canaleta 1 - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Canaleta 2 - pCR-Blunt::*P_{sigA}*; Canaleta 3 - pCR-Blunt::*P_{sigD}*; Canaleta 4 - pCR-Blunt::*P_{sigH}*.

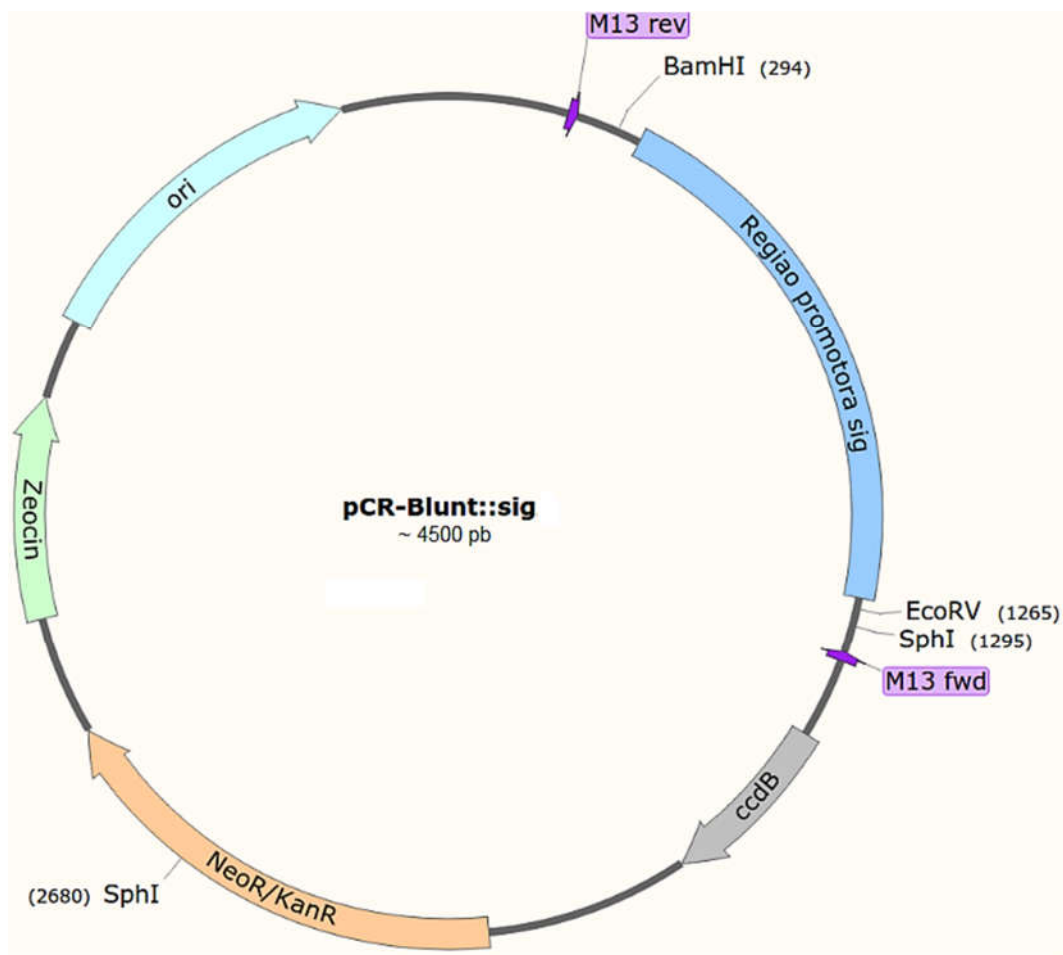


Figura 4.9 Representação esquemática das construções pCR-Blunt::P_{sigA}, pCR-Blunt::P_{sigB}, pCR-Blunt::P_{sigE}, pCR-Blunt::P_{sigK}, e pCR-Blunt::P_{sigM}. Somente a região promotora, representada em azul, difere entre esses plasmídios. As regiões das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores universais M13 e os sítios das endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I estão representados. (SnapGene)

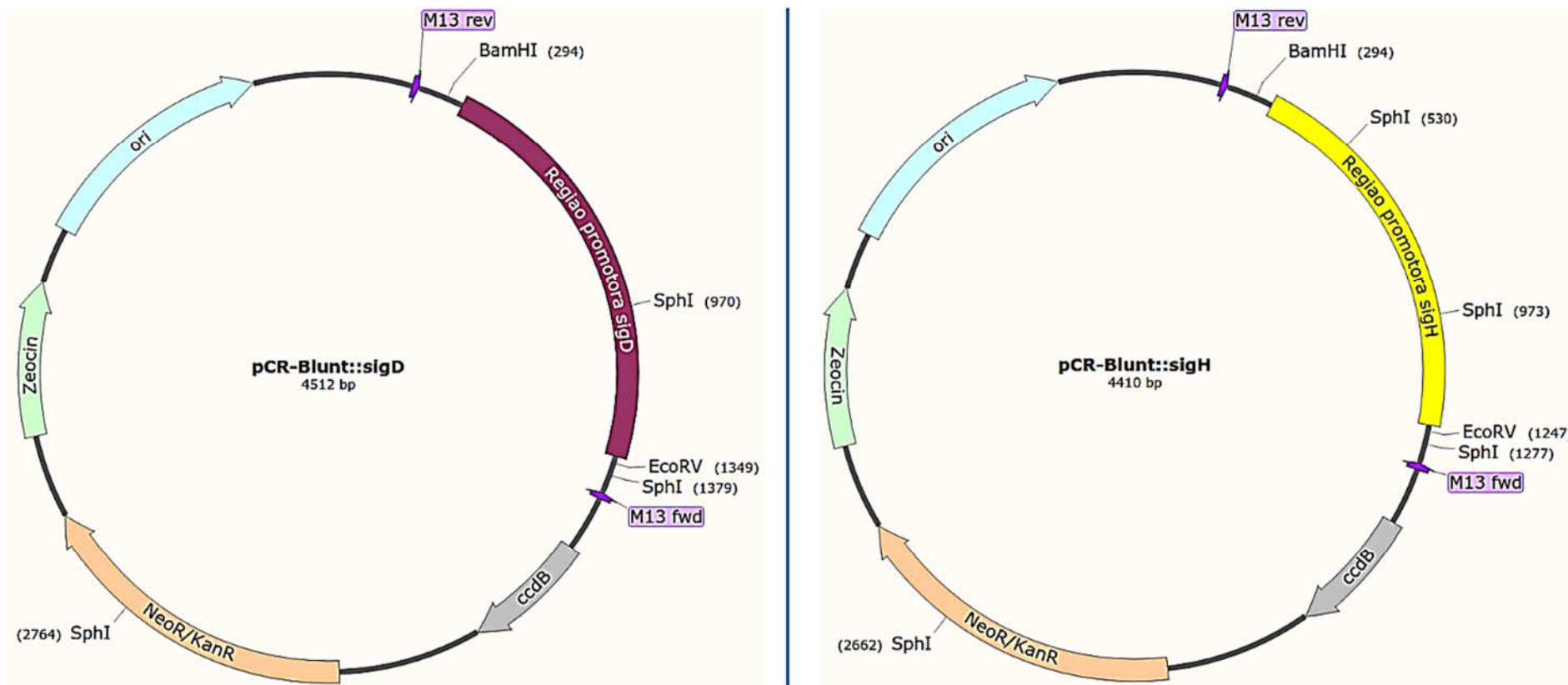


Figura 4.10 Mapa genético das construções pCR-Blunt::P_{sigD} e pCR-Blunt::P_{sigH}. Como pode ser observado nos mapas circulares, existem um sítio reconhecido pela endonuclease de restrição *SphI* na região promotora do gene *sigD* e dois sítios reconhecidos pela mesma enzima na região promotora do gene *sigH*. As regiões das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores universais M13 e os sítios da endonuclease de restrição *BamHI* também estão representados. (SnapGene)

4.1.3 Subclonagens no vetor pSM20

Para realização de subclonagem, o plasmídio pSM20 *promoterless* foi linearizado por digestão completa (3.7.2) realizada com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I, e os fragmentos de DNA liberados após as digestões com as mesmas endonucleases de restrição das construções pCR-Blunt::*P*_{sigA}, pCR-Blunt::*P*_{sigB}, pCR-Blunt::*P*_{sigD}, pCR-Blunt::*P*_{sigE}, pCR-Blunt::*P*_{sigH}, pCR-Blunt::*P*_{sigK}, e pCR-Blunt::*P*_{sigM} foram ligados (Item da metodologia) à montante da sequência codificadora do gene *gfp*. Os produtos das ligações foram transformados em *E. coli* Top10 (Invitrogen) como explicado no item 3.6.1.

Os clones bacterianos recombinantes foram selecionados com sucesso por PCR de colônia, e uma colônia de cada construção foi selecionada e cultivada em meio LB para posterior purificação de DNA plasmidial (3.7.6) Na resolução eletroforética mostrada na Figura 4.11 podemos observar o produto da reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada região promotora. As bandas de DNA no tamanho de, aproximadamente, 1000 pb, confirmam a presença dos fragmentos correspondentes às regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores σ^A , σ^B , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K , e σ^M .

Assim como foi feito para as construções pCR-Blunt::*P*_{sig}, foi realizada a digestão dos insertos clonados nas construções pSM20::*P*_{sig} com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I. Na resolução eletroforética dos produtos das digestões realizadas (Figura 4.12), podemos observar duas bandas de DNA, uma de 4210 pb e uma de, aproximadamente, 1000pb para as construções pSM20::*P*_{sigA}, pSM20::*P*_{sigB}, pSM20::*P*_{sigD}, pSM20::*P*_{sigE}, pSM20::*P*_{sigH}, pSM20::*P*_{sigK} e pSM20::*P*_{sigM}, correspondentes aos fragmentos liberados de cada região promotora.

Para as construções pSM20::*P*_{sigD} e pSM20::*P*_{sigH} é possível observar outras bandas de DNA, pois ambas regiões promotoras apresentam sítios extras para a endonuclease de restrição *Sph*I. Diferentemente do vetor pCR::Blunt, o vetor pSM20 contém apenas um sítio para *Sph*I em seu arcabouço (Figura 4.13), o que explica os perfis diferentes de bandas após as digestões enzimáticas.

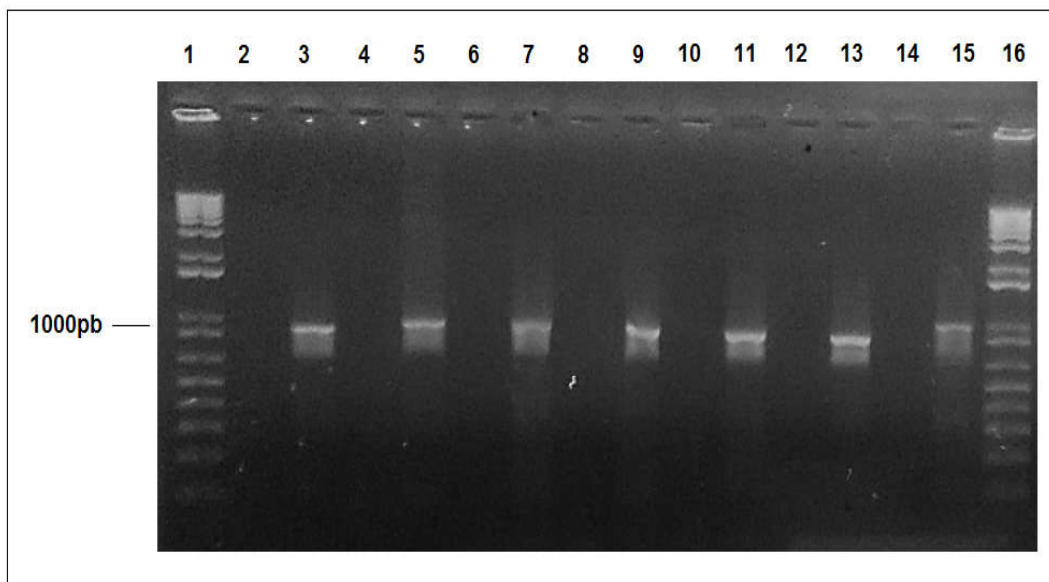


Figura 4.11. Resolução eletroforética dos produtos de PCR obtidos utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada região promotora e plasmídios referentes às construções pSM20::*P_{sig}*, para a confirmação de clonagens. As bandas amplificadas apresentam o tamanho esperado de aproximadamente 1000pb. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo *sigA*; Canaleta 3: pSM20::*P_{sigA}*; Canaleta 4: Controle negativo *sigB*; Canaleta 5: pSM20::*P_{sigB}*; Canaleta 6: Controle negativo *sigD*; Canaleta 7: pSM20::*P_{sigD}*; Canaleta 8: Controle negativo *sigE*; Canaleta 9: pSM20::*P_{sigE}*; Canaleta 10: Controle negativo *sigH*; Canaleta 11: pSM20::*P_{sigH}*; Canaleta 12: Controle negativo *sigK*; Canaleta 13: pSM20::*P_{sigK}*; Canaleta 14: Controle negativo *sigM*; Canaleta 15: pSM20::*P_{sigM}*; Canaleta 16: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

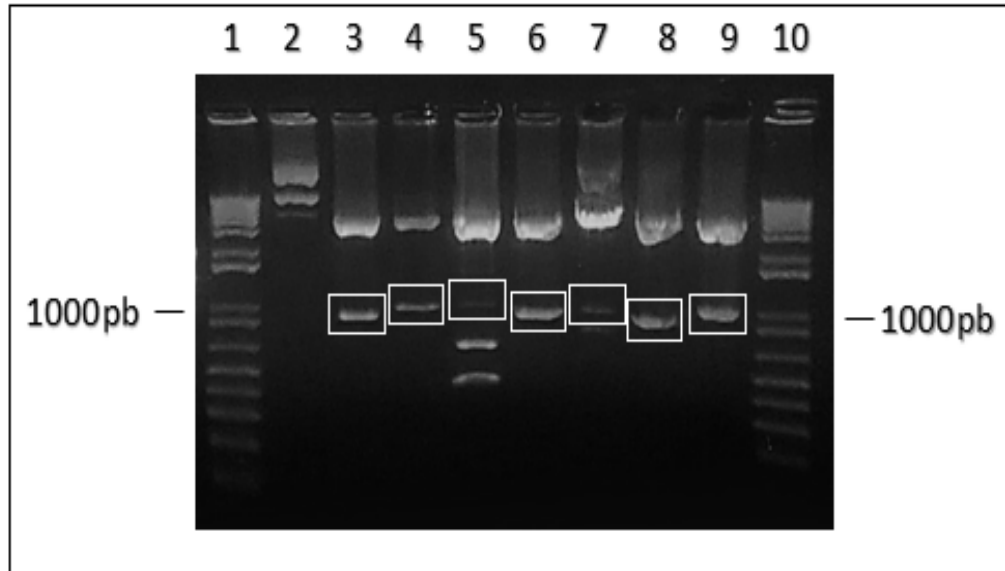


Figura 4.12 Resolução eletroforética das digestões realizadas utilizando as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I e os plasmídios referentes às construções pSM20::*P_{sig}*, para confirmação das clonagens dos fragmentos. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo (plasmídio não digerido); Canaleta 3: pSM20::*P_{sigA}*; Canaleta 4: pSM20::*P_{sigB}*; Canaleta 5: pSM20::*P_{sigD}*; Canaleta 6: pSM20::*P_{sigE}*; Canaleta 7: pSM20::*P_{sigH}*; Canaleta 8: pSM20::*P_{sigK}*; Canaleta 9: pSM20::*P_{SigM}* e Canaleta 10: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os retângulos destacam os fragmentos de aproximadamente 1000pb liberados após a digestão. Para as construções pCR-Blunt: *P_{SigD}* (5) e pCR-Blunt: *P_{SigH}* (7) é possível observar outras bandas devido à presença de um sítio adicional para a enzima de restrição *Sph*I na região promotora.

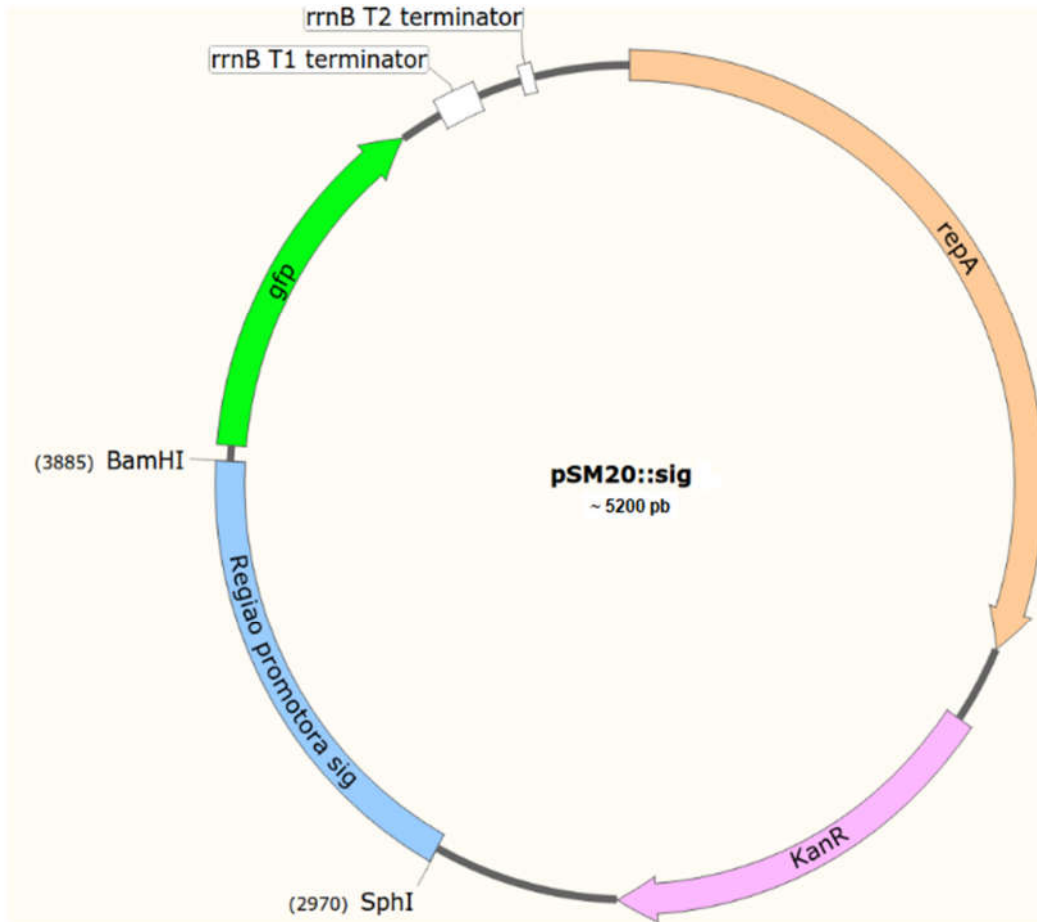


Figura 4.13 Representação esquemática das construções pSM20::P_{sig}. Somente a região promotora, representada em azul, difere entre os plasmídios. As regiões das sequências dos genes *gfp*, *kan* e *repA*, assim como os sítios reconhecidos pelas endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sph*I, estão representadas. Existem sítios adicionais para *Sph*I nas regiões promotoras dos genes *sigD* e *sigH* (dados não mostrados na figura). (SnapGene)

4.1.4 Clonagem no vetor pSM20 utilizando *Gibson Assembly*

A construção do plasmídeo pSM20 contendo a região promotora do gene codificador do fator σ^C foi realizada utilizando o método de clonagem conhecido por *Gibson Assembly* (3.8.5). Este método foi utilizado devido à dificuldade para amplificarmos, inicialmente, o fragmento correspondente à região promotora do gene *sigC*, para realização da clonagem utilizando o método tradicional baseado no uso de DNA ligase. Apesar de obtermos um fragmento do tamanho esperado (aproximadamente 1000pb), utilizando os iniciadores confeccionados paralelamente aos iniciadores usados nas construções para as demais regiões promotoras, a digestão deste fragmento purificado ou clonado no plasmídeo pCR-Blunt, utilizando a endonuclease de restrição *SphI*, resultou em um perfil de bandeamento diferente do esperado e similar ao que seria obtido caso houvesse um sítio reconhecido por *SphI* dentro da região promotora (dados não mostrados). No entanto, análises de bioinformática mostraram que a sequência de P_{sigC} , diferentemente de P_{sigD} e P_{sigH} , não apresenta sítios para esta endonuclease de restrição. Nesse contexto, confeccionamos novos oligonucleotídeos iniciadores que, além de se anelarem a sequências diferentes das selecionadas anteriormente, são apropriados para a clonagem no vetor pSM20 utilizando o método de *Gibson Assembly*.

Após a linearização do plasmídeo pSM20 com *BamHI* e a sua ligação ao fragmento amplificado e purificado referente à região de P_{sigC} , o sítio para essa endonuclease de restrição foi perdido (Figura 3.3). O mapa genético do plasmídeo pSM20:: P_{sigC} pode ser visualizado na Figura 4.14. Para confirmar a clonagem da região promotora do gene *sigC*, foram realizadas digestões utilizando as endonucleases de restrição *EcoRV* e *BamHI*, ambas presentes no múltiplo sítio de clonagem do plasmídeo pSM20.

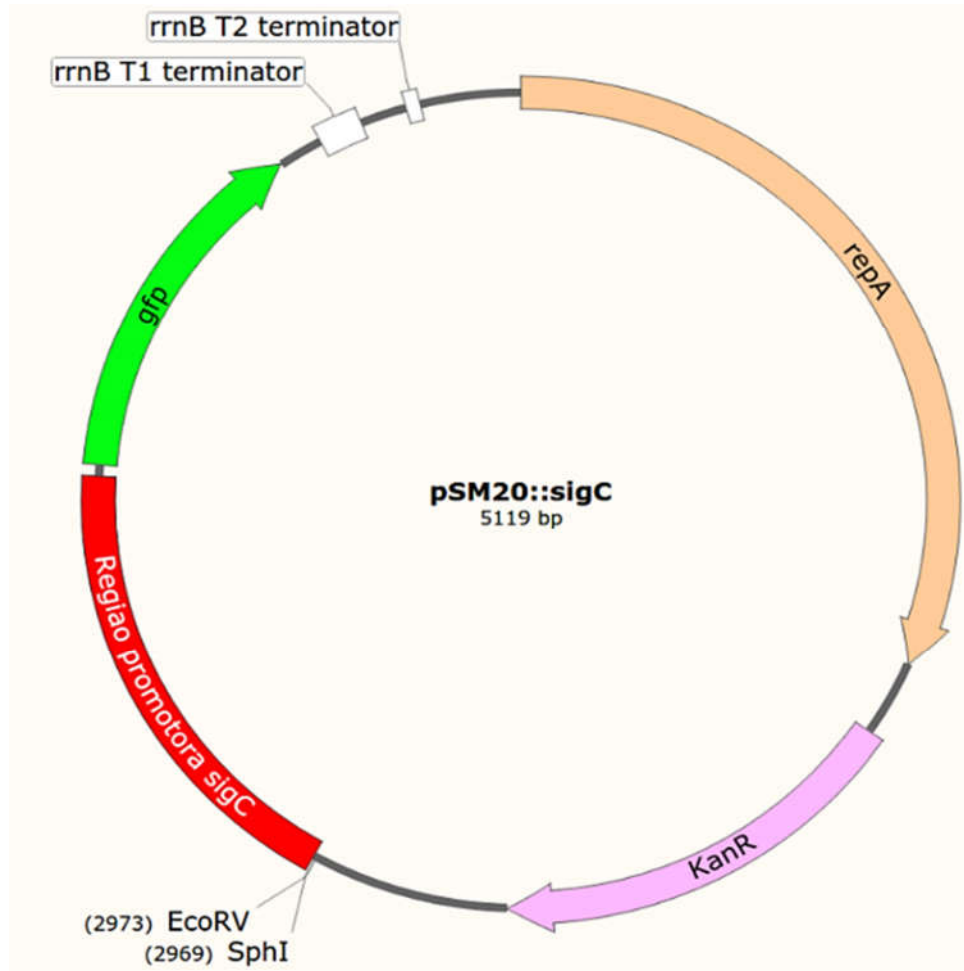


Figura 4.14 Representação esquemática da construção pSM20::P_{sigC}. A região promotora do gene *sigC* se encontra a montante da sequência codificadora da proteína fluorescente GFP. Os sítios reconhecidos pelas endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RV estão representados. (SnapGene)

A Figura 4.15 mostra a eletroforese das digestões realizadas com a enzima de restrição *Eco*RV para os plasmídios pSM20 (controle *promoterless*) e pSM20::P_{sigC}. Nota-se que o fragmento de DNA referente ao plasmídeo pSM20::P_{sigC} linearizado apresenta tamanho maior do que o plasmídeo pSM20 *promoterless* linearizado. Este resultado é esperado devido à inclusão da região promotora do gene *sigC*, correspondente a 948 pb, no plasmídeo pSM20::P_{sigC}. Além disso, não houve linearização do plasmídeo pSM20::P_{sigC} após a realização da reação de digestão com a endonuclease de restrição *Bam*HI, o que confirma a perda do sítio para essa enzima após a realização da clonagem pelo método *Gibson Assembly*.

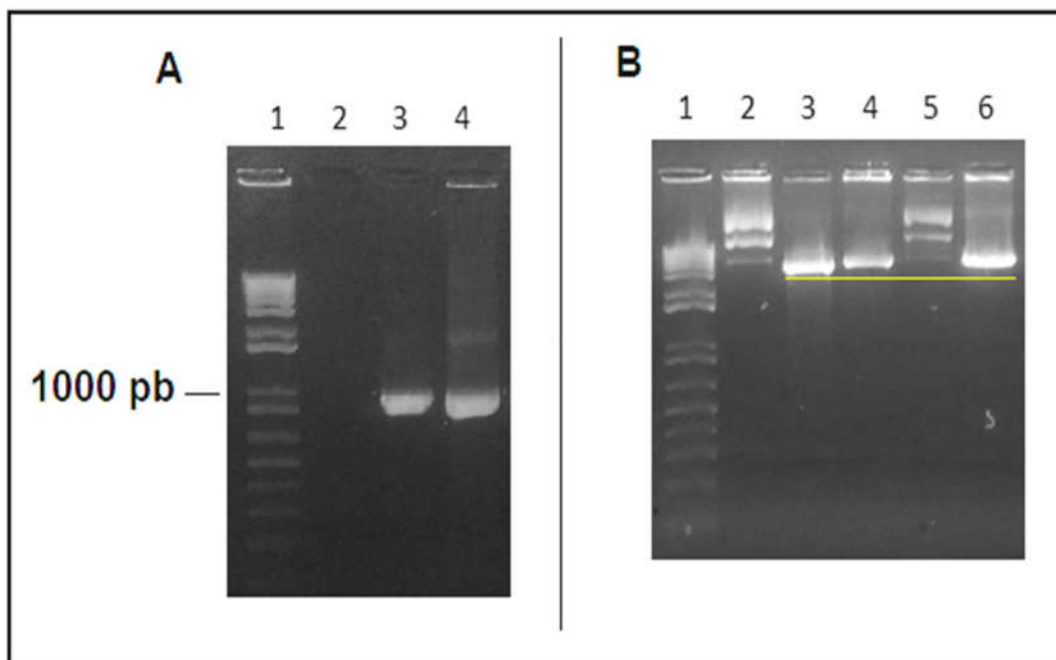


Figura 4.15. Resolução eletroforética dos produtos de PCR e das digestões realizadas para a construção do plasmídeo pSM20::*P_{sigC}*. **A-** PCR realizada com oligonucleotídeos específicos para a região promotora do gene *sigC* - Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação de PCR; Canaleta 3: Genoma de 1002; Canaleta 4: pSM20::*P_{sigC}*. **B-** Digestões realizadas com a construção pSM20::*P_{sigC}* - Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo (plasmídeo não digerido); Canaleta 3: pSM20 (*promoterless*) digerido com a enzima *EcoRV*; Canaleta 4: pSM20::*P_{sigC}* digerido com a enzima *EcoRV*; Canaleta 5: pSM20::*P_{sigC}* digerido com a enzima *BamHI*; Canaleta 6: Controle positivo pSM20::*P_{sigA}* digerido com a enzima *BamHI*. A linha representada facilita a visualização da posição das bandas no gel após a digestão dos plasmídios.

4.1.5 Sequenciamento e montagem dos plasmídios

Após o sequenciamento na plataforma Illumina, as sequências de DNA das construções plasmidiais foram analisadas. As leituras obtidas apresentaram valor de qualidade *Phred* acima de 30 e uma cobertura extremamente alta, com mais de 6 milhões de sequências (dados não mostrados). Devido ao excesso de dados obtidos, uma amostragem das reads foi realizada com o auxílio da ferramenta Seqtk, e uma amostra de 10.000 reads foi retirada dos dados brutos. O pipeline Unicycler realizou

com sucesso a montagem plasmidial, e apenas um *contig* circularizado foi encontrado para plasmídio sequenciado. Os mapas genéticos dos plasmídios foram gerados utilizando o software SnapGene e as sequências das respectivas regiões promotoras de cada gene codificador de fator sigma foram localizadas (Apêndice 1 ao 8). O alinhamento das sequências indicou 100% de cobertura e 100% identidade, indicando que as regiões promotoras foram clonadas com sucesso e sem mutações nucleotídicas (dados não mostrados).

Considerando-se todo o trabalho, foram geradas as seguintes construções plasmidiais: pSM20::*P_{sigA}*, pSM20::*P_{sigB}*, pSM20::*P_{sigC}*, pSM20::*P_{sigD}*, pSM20::*P_{sigE}*, pSM20::*P_{sigH}*, pSM20::*P_{sigK}* e pSM20::*P_{sigM}*. Todas as construções foram individualmente transformadas na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* (3.6.2).

4.2. Indução das regiões promotoras em resposta a estresses abióticos

Bactérias patogênicas, como *C. pseudotuberculosis*, enfrentam diversas condições adversas no ambiente externo ou durante seu curso de infecção no hospedeiro. Essas condições podem variar rapidamente, exigindo que a bactéria seja capaz de se adaptar de forma eficiente ao estímulo presente. Esta adaptação é possível através da alteração na atividade de fatores transcricionais. Os fatores sigma são capazes de atuar regulando a expressão de subconjuntos de genes específicos de forma coordenada, devido ao seu papel essencial no reconhecimento do promotor no DNA pela holoenzima da RNAP. Como citado anteriormente, todas bactérias possuem pelo menos um fator sigma primário, que é essencial para o desempenho das funções biológicas básicas e metabolismo da célula. Além deste, as bactérias também possuem fatores sigma alternativos, os quais são geralmente responsáveis pela resposta a estímulos específicos proporcionados por estímulos ambientais.

O genoma de *C. pseudotuberculosis* possui oito genes codificadores de fatores sigma. Dentre os fatores sigma encontrados nesta bactéria, o fator σ^A , presumidamente, corresponde ao fator sigma principal e essencial à manutenção das funções fisiológicas na célula, enquanto que o fator alternativo σ^B está provavelmente envolvido na ativação de mecanismos gerais de resposta ao estresse. Os demais fatores sigma alternativos, σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M , são similares a fatores sigma de função extracitoplasmática (σ^{ECF}) em outras bactérias filogeneticamente próximas (BRUIJN, 2016).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a indução diferencial de fluorescência (IDF) referente à proteína GFP, expressa sob o controle das regiões promotoras selecionadas em resposta a estresses abióticos. Inicialmente, cada linhagem recombinante de *C. psedutuberculosis*, contendo, individualmente, plasmídeo com a região promotora de um fator sigma, foi cultivada em condições normalmente utilizadas em laboratório, com acréscimo do antibiótico Canamicina. Nestas condições, cinco linhagens recombinantes derivadas da linhagem 1002, contendo as construções pSM20::*P_{sigA}*, pSM20::*P_{sigB}*, pSM20::*P_{sigD}*, pSM20::*P_{sigE}* e pSM20::*P_{sigH₂}* foram capazes de sintetizar GFP. Entretanto, não foi detectada a produção de GFP pelas linhagens contendo as construções pSM20::*P_{sigC}*, pSM20::*P_{sigK}* e pSM20::*P_{sigM}* (Figura 4.16).

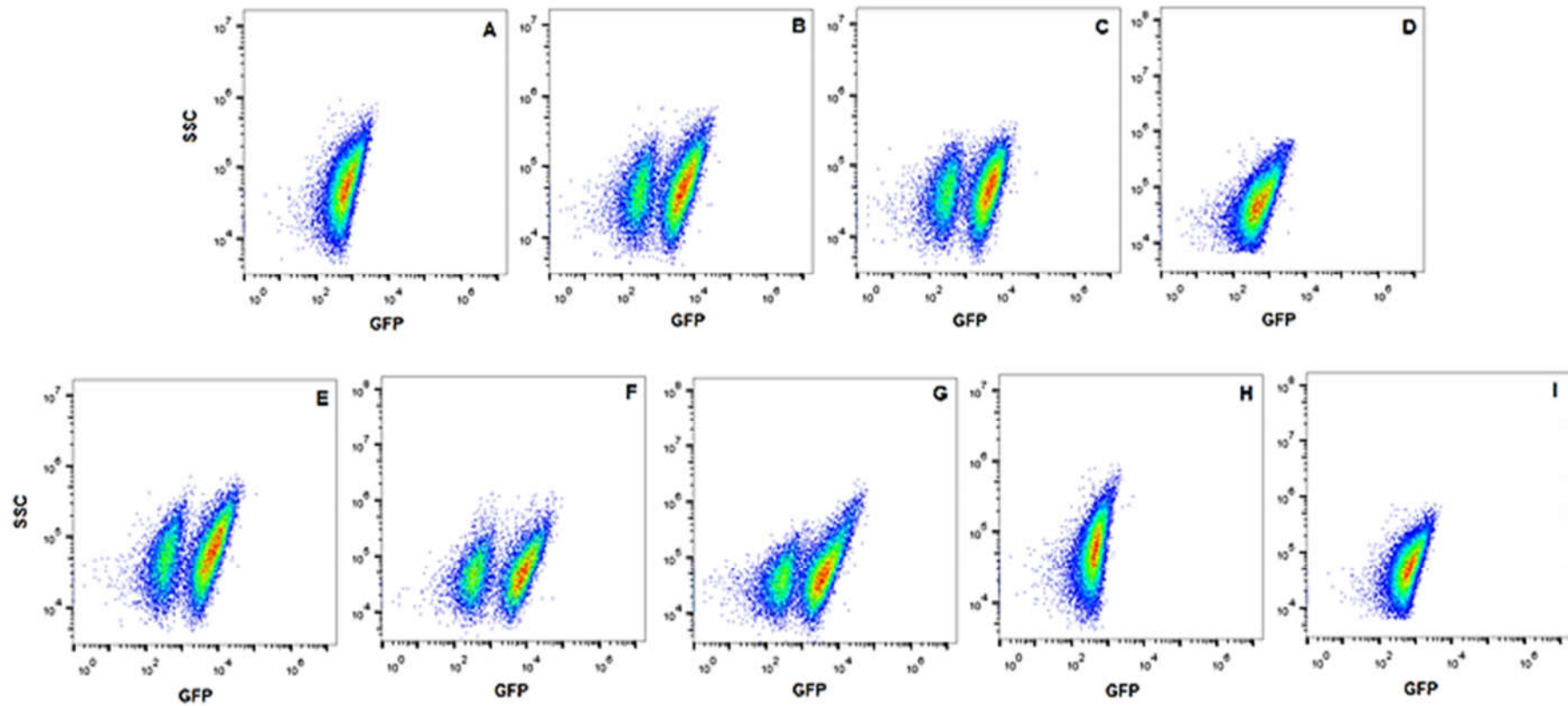


Figura 4.16. A figura representa a ativação da produção de GFP pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* contendo as construções pSM20::P_{sig}, em condições rotineiras de cultivo. A- 1002 pSM20 (*promoterless*); B- pSM20::PSigA; C- pSM20::PSigB; D- pSM20::PSigC; E- pSM20::PSigD; F- pSM20::PSigE; G- pSM20::PSigH; H- pSM20::PSigK; I- pSM20::PSigM. Não foi observada a produção de GFP pelas linhagens contendo as regiões promotoras dos genes *sigC* (D), *sigK* (H) e *sigM* (I).

Em seguida, foram avaliados os perfis de ativação de GFP das linhagens contendo as construções pSM20::*P_{sigA}*, pSM20::*P_{sigB}*, pSM20::*P_{sigC}*, pSM20::*P_{sigD}*, pSM20::*P_{sigE}*, pSM20::*P_{sigH}*, pSM20::*P_{sigK}* e pSM20::*P_{sigM}*, em resposta aos estresses oxidativo, osmótico e de superfície celular – este último induzido pela exposição à lisozima e ao surfactante SDS. Paralelamente, a linhagem 1002 pSM20 *promoterless* foi utilizada como controle negativo para todas as condições experimentais testadas. Como esperado, não foram observadas alterações significativas nos níveis de fluorescência para esse controle, entre as diferentes condições testadas, uma vez que não há sequência promotora capaz de induzir a expressão de GFP (Figura 4.17 A). Entretanto, é possível observar que a população de células carreando o plasmídeo controle emite níveis basais de fluorescência, como foi também observado para populações de células do tipo selvagem levadas ao citômetro de fluxo (dados não mostrados). Além disso, a porcentagem de células que poderiam ter apresentado indução de GFP é insignificante, em comparação com os resultados obtidos para as linhagens portadoras dos plasmídios carreando promotores dos genes *sigA*, *sigB*, *sigD*, *sigE* e *sigH* (Figuras 4.16 e 4.17 B).

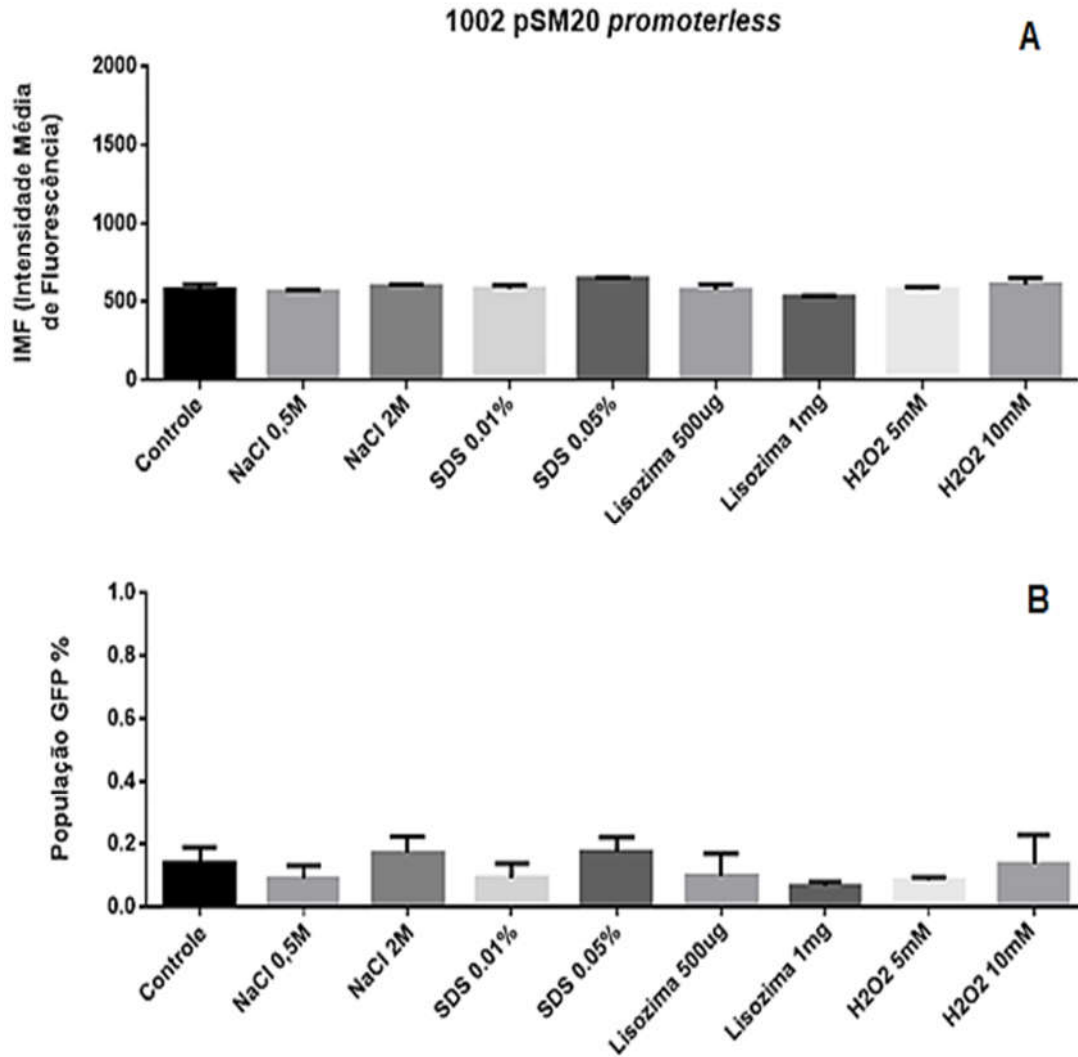


Figura 4.17. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem 1002 pSM20 (*promoterless*) a diferentes condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses.

4.2.1 Indução da região promotora do gene *sigA*

Em *C. pseudotuberculosis*, o gene *sigA* codifica um fator transcricional pertencente à família $\sigma 70$, presumivelmente essencial para o desempenho das funções celulares básicas (Figura 1.3). Apesar de ser descrito como regulador de genes *housekeeping*, o fator sigma primário também pode estar envolvido com a expressão de genes de virulência. Em *E. coli*, o fator transcricional RpoD, similar ao fator σ^A em bactérias Gram-positivas, ativa a maioria dos genes essenciais para o crescimento exponencial dessa bactéria (PAGET; HELMANN, 2003). Entretanto, o gene *rpoD* também pode ser ativado para regular a expressão de genes envolvidos na resposta às condições de estresse nutricional e choque térmico. Assim, este fator sigma está possivelmente relacionado à virulência dessa bactéria (TAYLOR et al., 1984). Na bactéria patogênica *M. tuberculosis*, apesar do nível de expressão do gene *sigA* se manter constante diante de diversas condições de estresse ambiental, há um aumento da sua atividade transcricional durante infecções em macrófagos (VOLPE et al., 2006).

Para a linhagem contendo o plasmídeo com a região promotora do gene *sigA*, foi observado um aumento significativo da IMF na concentração de 2M de NaCl, em comparação com a condição controle de crescimento, apesar de não ter sido observada diferença significativa na frequência populacional produtora de GFP (Figura 4.18 A e B). Pinto *et al.* (2014) observaram a indução da transcrição do gene *sigA* após a exposição de *C. pseudotuberculosis* ao estresse osmótico, além de térmico. Ainda, a IMF apresentou um aumento significativo após a exposição bacteriana ao surfactante SDS nas concentrações de 0,01% e 0,05% (Figura 4.18 A). A porcentagem de células produtoras de GFP foi significativamente aumentada na concentração de 0,05% de SDS (Figura 4.18 B). Estes resultados sugerem que, em resposta a determinadas condições ambientais, o fator σ^A de *C. pseudotuberculosis* pode estar exercendo a função de fator sigma alternativo. Para os outros estresses, não foram observadas diferenças significativas na IMF (Figura 4.18).

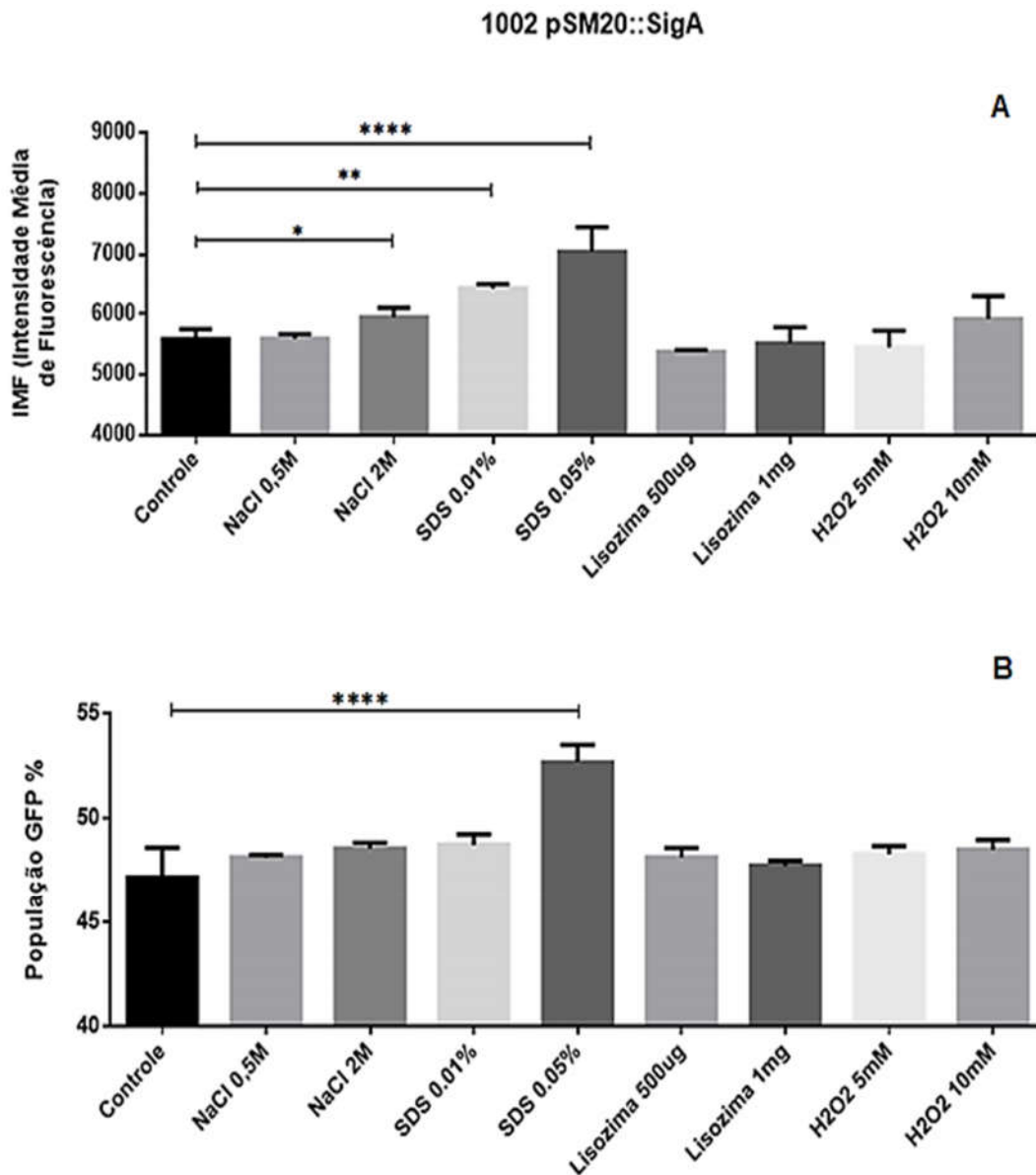


Figura 4.18. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::P_{sigA} às condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses. As diferenças são significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (One-Way ANOVA e Tukey).

4.2.2 Indução da região promotora do gene *sigB*

Em *B. subtilis*, Price et al. (2001) demonstraram que o regulon de σ^B contém pelo menos 127 genes, incluindo aqueles com função de regulação transcricional, transporte de membrana e resistência ao estresse. Outros estudos demonstraram que o gene *sigB* contribui para a virulência de diversos patógenos Gram-positivos (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005). Em *L. monocytogenes*, esse fator sigma alternativo contribui para sua sobrevivência diante de diversas condições adversas, incluindo os estresses ácido, alcoólico, térmico e oxidativo (CHATURONGAKUL et al., 2008; FERREIRA et al., 2003; FERREIRA; O'BYRNE; BOOR, 2001). Mutantes para o σ^B nessa bactéria apresentam virulência reduzida em murinos e diminuição na sua capacidade de invadir células epiteliais (GARNER et al., 2006; NADON et al., 2002). Em *S. aureus*, um mutante para o fator σ^B apresentou diminuição significativa na formação de biofilme, que é uma matriz polimérica capaz de conferir proteção bacteriana contra alguns antibióticos e a resposta imune do hospedeiro. Além disso, o biofilme possui um papel crucial na adaptação bacteriana a infecções crônicas (MITCHELL et al., 2010; TUCHSCHERR et al., 2015).

Para a linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, contendo plasmídio com a região promotora do gene *sigB*, foram observadas diferenças significativas na IMF após o estresse induzido por SDS, nas concentrações finais de 0,01% e 0,05%, em comparação com a condição controle de cultivo (Figura 4.19A). A frequência populacional produtora de GFP apresentou um aumento significativo ($p < 0,0001$) apenas na concentração de 0,05% do SDS (Figura 4.19B). Esse aumento significativo na frequência populacional indica que esse estresse induziu a ativação de mais células produtoras de GFP dentro da população.

Como o σ^B é considerado um fator sigma global de resposta geral ao estresse, seria esperado que o mesmo fosse ativado em diferentes condições experimentais também em *C. pseudotuberculosis*. Apesar disso, estudos anteriores com essa bactéria demonstraram que o gene codificador desse fator sigma só teve maior taxa de transcrição diante do estresse ácido (PINTO et al. 2014), condição que não foi avaliada nesse estudo. Em *C. diphtheria*, bactéria filogeneticamente próxima a *C. pseudotuberculosis*, foi demonstrado que o número de transcritos do gene codificador do σ^B é elevado em resposta a condições como estresse ácido, alcoólico, térmico e de superfície celular (induzido por SDS). Entretanto, altas concentrações de NaCl e H_2O_2 não induzem a transcrição do gene *sigB* nessa bactéria (ORAM; JACOBSON; HOLMES,

2006). Similarmente, neste trabalho, a linhagem 1002 pSM20::*P_{sigB}* não apresentou alterações diante dos estresses osmótico e oxidativo (Figura 4.19).

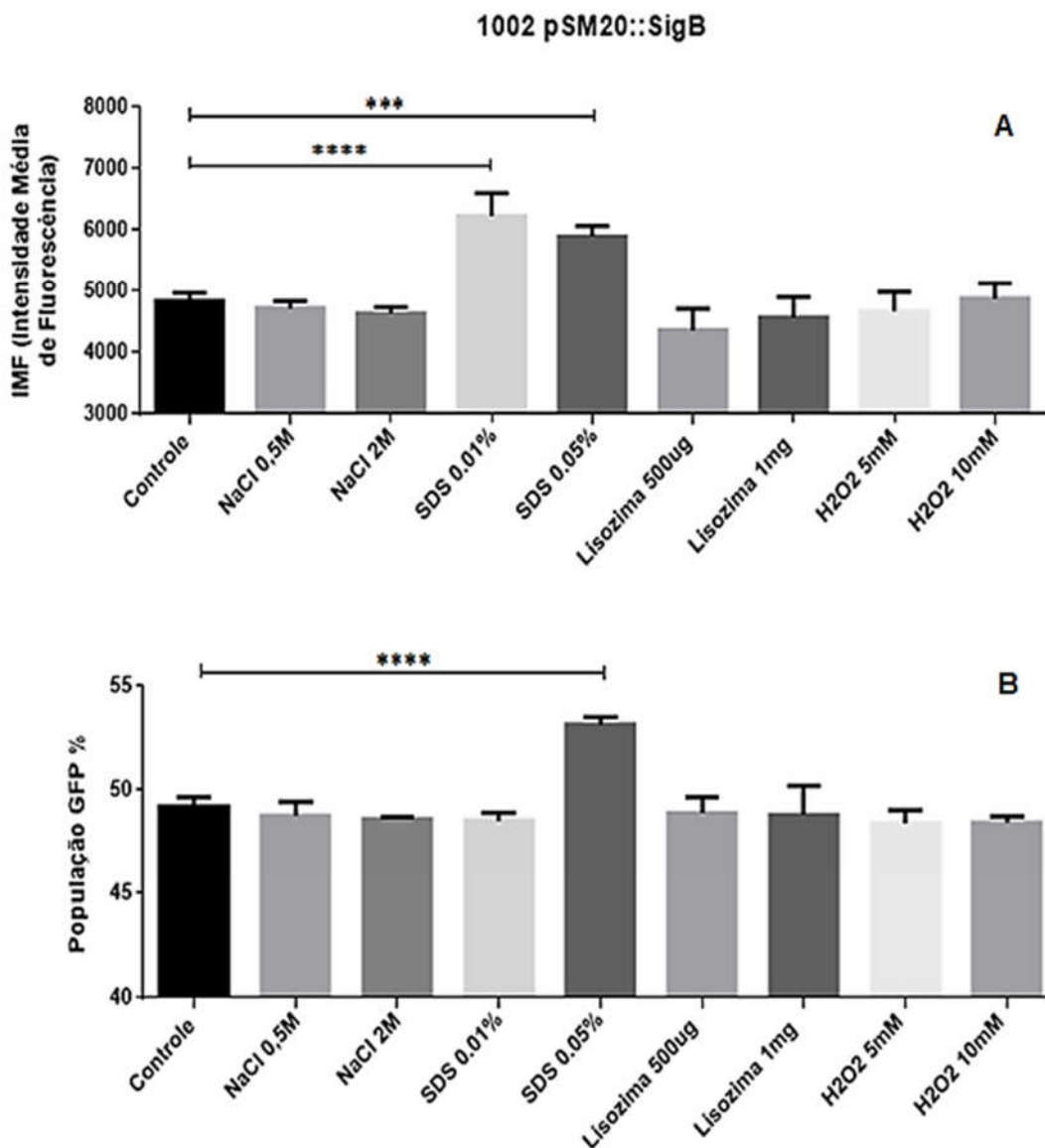


Figura 4.19. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::*P_{sigB}* às condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses. As diferenças são significativas para: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (One-Way ANOVA e Tukey).

4.2.3 Indução da região promotora do gene *sigD*

Um estudo envolvendo o fator σ^D de *M. tuberculosis* indicou que uma linhagem mutante para esse fator transcricional induz menor secreção de TNF- α por macrófagos cultivados *in vitro*, em comparação com a linhagem selvagem parental. Além disso, o tempo de sobrevivência de camundongos infectados por este mutante é maior do que o observado nas infecções com a linhagem selvagem (CALAMITA et al., 2005). Ainda nesse estudo, foi identificado que o fator σ^D está relacionado à indução da expressão de genes associados com a síntese de unidades ribossomais e enzimas envolvidas na biossíntese de adenosina trifosfato (ATP). Em *C. glutamicum*, Ikeda et al. (2009) associaram esse fator transcricional com a expressão de genes cujos produtos respondem a condições de hipóxia, uma vez que uma linhagem mutante para o fator σ^D perdeu sua habilidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio.

Um outro estudo avaliou, utilizando PCR em tempo real, a variação na expressão dos genes *sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK* e *sigM* de *C. pseudotuberculosis*, quando a bactéria é cultivada em meio BHI e em Soro Fetal Bovino (SFB). De forma interessante, somente o gene *sigD* apresentou aumento significativo de expressão após o cultivo em SFB, meio que mimetiza fatores do hospedeiro. Este resultado sugere, portanto, que o fator σ^D ativa mecanismos envolvidos na virulência de *C. pseudotuberculosis* (CARVALHO et al., 2013).

Como pode ser observado na Figura 4.20A, os ensaios realizados com a linhagem 1002 pSM20::*P_{sigD}* resultaram em alterações significativas na IMF após exposição ao estresse osmótico na concentração de 2M, ao estresse de superfície celular gerado por SDS na concentração de 0,05%, e ao estresse oxidativo nas concentrações de 5mM e 10mM de H₂O₂. Na frequência populacional produtora de GFP, só foram observadas diferenças significativas após exposição ao SDS, no qual houve um aumento em ambas concentrações de 0,01% e 0,05% (Figura 4.20B). Mais uma vez, o estresse induzido por SDS foi capaz de promover a ativação de mais células produtoras de GFP dentro da população.

Em 2014, Pinto et al. demonstraram que o gene *sigD* de *C. pseudotuberculosis* tem sua expressão induzida após exposição aos estresses osmótico – gerado por NaCl 2M – e térmico (50°C). Os resultados de ativação promotora do gene *sigD* apresentados neste trabalho corroboram o envolvimento do fator σ^D na resposta ao estresse osmótico. Além disso, os resultados também indicam a ativação da região promotora do gene *sigD* – e subsequente indução de GFP – após exposição a ambas concentrações de H₂O₂ testadas. *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria produtora de catalase e, portanto, é

capaz de neutralizar altas concentrações de H_2O_2 , produzindo as moléculas atóxicas H_2O e O_2 . Esta habilidade é essencial para *C. pseudotuberculosis* manter, durante a infecção, sua homeostase no ambiente intrafagossomal, que é rico em ROS (BAIRD; FONTAINE, 2007). Entretanto, a exposição a ROS pode ocasionar danos a diversas moléculas presentes na célula, incluindo o DNA cromossomal. Em *M. Tuberculosis*, o fator σ^D foi associado à regulação de genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (RAMAN et al., 2004). Assim, é possível que o fator σ^D esteja relacionado à ativação de genes necessários ao funcionamento da maquinaria de reparo do DNA em *C. pseudotuberculosis*, após a exposição ao H_2O_2 . Ainda é importante ressaltar que, no presente trabalho, a região promotora desse fator sigma foi ativada em três das quatro condições de estresse avaliadas, sugerindo a existência de um conjunto de genes ativados por σ^D e envolvidos em diferentes mecanismos de resposta a estresses.

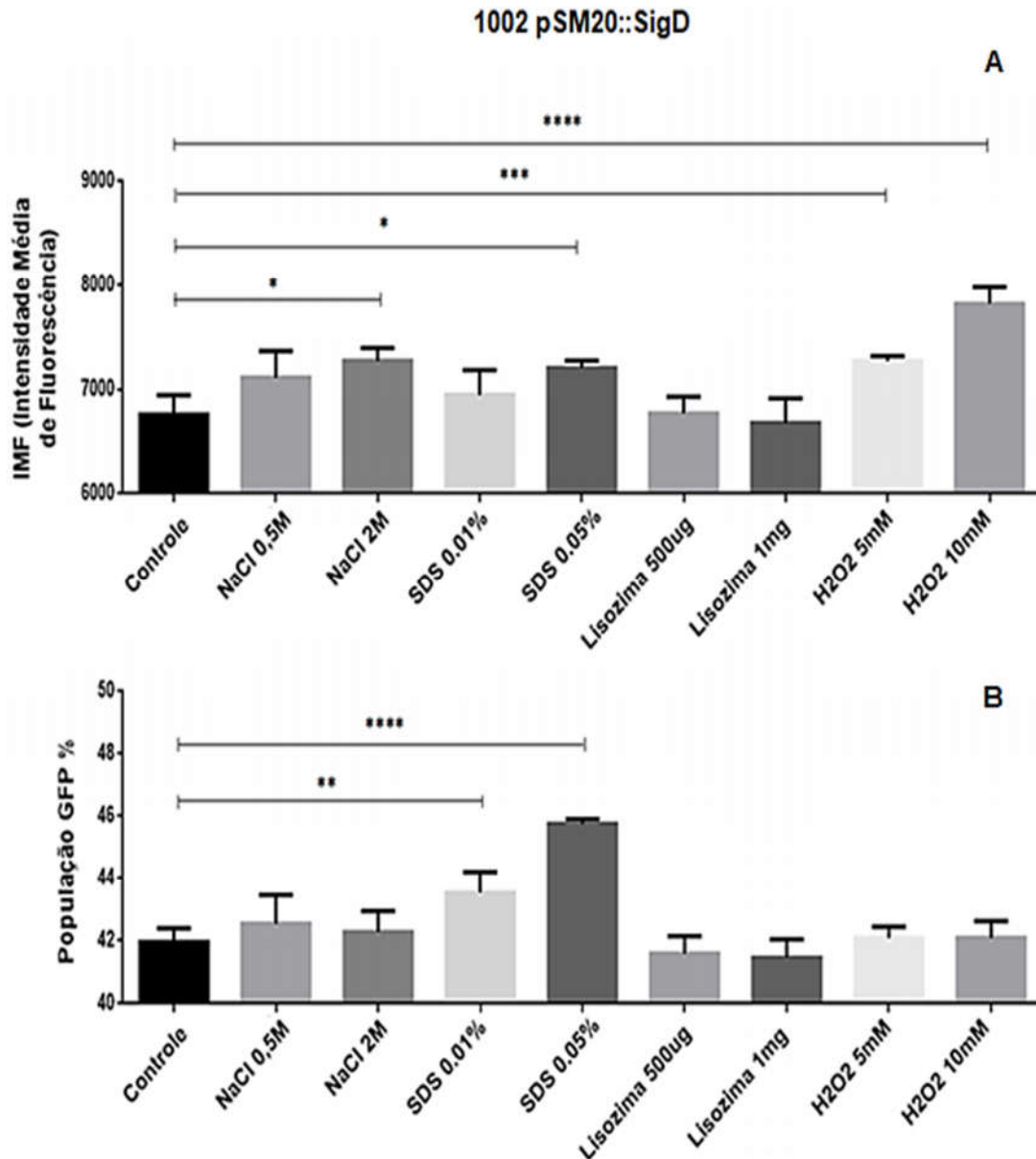


Figura 4.20. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::P_{sigD} às condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses. As diferenças são significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (One-Way ANOVA e Tukey).

4.2.4 Indução da região promotora do gene *sigE*

O envolvimento do fator σ^E na resposta ao estresse já foi relatado para diversas bactérias patogênicas. Em *E. coli*, o gene codificador do fator σ^E (*rpoE*) é modulado por proteínas de superfície de membrana e está envolvido com a resposta ao estresse de alta temperatura (MECSAS et al., 1993). Ensaio com a bactéria *Haemophilus influenzae* demonstraram que a expressão do gene *rpoE* aumenta mais de 100 vezes após fagocitose por macrófagos, e que mutantes para esse gene têm sobrevivência reduzida dentro do ambiente fagocítico (CRAIG; NOBBS; HIGH, 2002). Outros trabalhos envolvendo o fator σ^E também foram realizados em actinobactérias. Em *M. tuberculosis*, foi demonstrado que o gene *sigE* está envolvido na resposta aos estresses térmico, oxidativo e gerado por SDS. Em *C. glutamicum*, o fator σ^E é ativado em resposta aos estresses de superfície celular gerados por SDS e lisozima (MANGANELLI et al., 2001; PARK et al., 2008).

No presente trabalho, a linhagem 1002 pSM20::*P_{sigE}* de *C. pseudotuberculosis* apresentou uma diminuição significativa na IMF na concentração de 2M de NaCl, condição na qual não foi observada variação significativa na frequência populacional produtora de GFP (Figura 4.21). Após a exposição ao estresse de superfície celular gerado por SDS, foram observados aumentos significativos na IMF para as concentrações de 0,01% e 0,05%, além do aumento significativo na frequência populacional produtora de GFP para as mesmas concentrações (Figura 4.21).

O dado de diminuição na IMF após estresse osmótico (Figura 4.21) corrobora outro dado da literatura, segundo o qual a exposição de *C. pseudotuberculosis* à concentração de 2M de NaCl ocasionou a diminuição da expressão do gene *sigE* (PINTO et al, 2014). Estudos de Pacheco e colaboradores (2010) demonstraram que uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o gene do σ^E se tornou mais susceptível ao estresse de superfície celular causado por lisozima e SDS. Entretanto, nossos resultados apontam para a ativação da região promotora do gene *sigE* apenas no estresse causado por SDS. Um estudo mostrou que *C. glutamicum* apresenta elevada resistência à lisozima, fato que pode ser explicado pela presença de ácidos micólicos na parede celular (HIRASAWA; WACHI; NAGAI, 2000). Considerando que *C. pseudotuberculosis* também possui ácidos micólicos no envoltório celular, é possível que seja necessária uma exposição mais prolongada da bactéria à lisozima para que os efeitos causados por esta enzima ativem o fator σ^E .

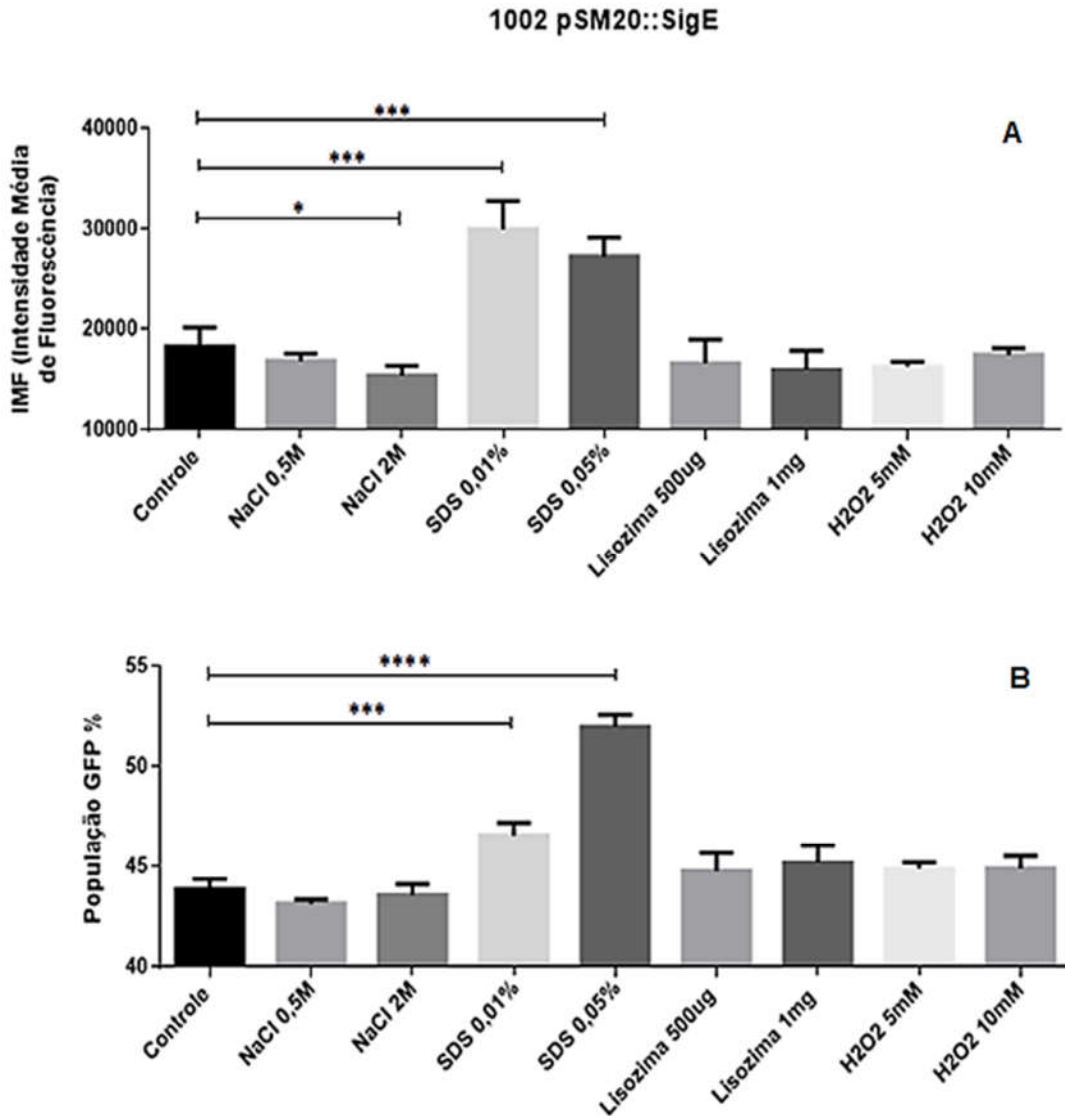


Figura 4.21. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::P_{sigE} às condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses. As diferenças são significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (One-Way ANOVA e Tukey).

4.2.5 Indução da região promotora do gene *sigH*

O fator σ^H desempenha um papel importante na resposta aos estresses oxidativo e de alta temperatura em *C. glutamicum* e *M. tuberculosis* (PÁTEK; NEŠVERA, 2011; SACHDEVA et al., 2010). Castro (2013) observou que, após 15 minutos de exposição ao estresse oxidativo gerado por 40mM de H_2O_2 , a expressão do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis* aumentou, sendo ainda mais acentuada após 60 minutos. Contudo, no presente trabalho, não foram observadas alterações significativas na ativação da região promotora do gene *sigH* em *C. pseudotuberculosis*, após exposição ao H_2O_2 nas concentrações de 5 e 10mM (Figura 4.22).

Em *C. pseudotuberculosis* o gene *rshA* está localizado a montante do gene codificador do fator σ^H , característica que também é observada em *M. tuberculosis*. Nesta última bactéria, a ativação do promotor do gene *sigH* ocorre após a desassociação do complexo formado entre o fator σ^H e seu inibidor cognato, o RshA. Em condições redutoras, o inibidor RshA se liga ao fator σ^H inibindo a ativação do próprio promotor σ^H e dos genes σ^H dependentes (SONG et al., 2003). O H_2O_2 age como agente oxidativo, porém, é possível que as concentrações utilizadas nesse estudo não tenham sido capazes de induzir a ativação promotora na construção pSM20::*P_{sigH}* em *C. pseudotuberculosis*. Outros ensaios podem ser realizados no futuro para trazer mais informações sobre o papel do promotor do gene codificador do fator σ^H na resposta ao estresse oxidativo em *C. pseudotuberculosis*.

Houve alteração nos níveis de IMF quando a linhagem 1002 contendo a construção pSM20::*P_{sigH}* foi submetida a dois dos quatro estresse testados. O estresse de superfície celular gerado por lisozima a 1 mg/mL ocasionou uma diminuição significativa na IMF, não havendo alterações na frequência populacional produtora de GFP para esse gerador de estresse (Figura 4.22). Estudos anteriores não haviam relatado o envolvimento do gene *sigH* na resposta ao estresse gerado por lisozima em *C. pseudotuberculosis*. Em *M. tuberculosis*, foi demonstrado que a PknB, proteína quinase associada à regulação da síntese da parede celular, é capaz de fosforilar o fator anti- σ^H , e o próprio σ^H , sugerindo uma relação entre a regulação da estrutura da parede celular e esse fator sigma (PARK; KANG; HUSSON, 2008). A diminuição da ativação promotora do gene codificador do σ^H após estresse gerado por lisozima indica sua relação na resposta a esse estresse em *C. pseudotuberculosis*. Como sua ativação é diminuída após o estresse, é possível que o gene *sigH* precise ser reprimido para que outros genes possam atuar na resposta ao estresse causado pela lisozima.

Para o estresse causado por SDS na concentração de 0,05%, foi observado aumento significativo na IMF e na frequência populacional produtora de GFP (Figura 4.22). Esses dados indicam que houve um aumento no número de células produtoras de GFP, e a maior intensidade de fluorescência observada é resultado da indução da região promotora do gene *sigH* em resposta a esse estresse.

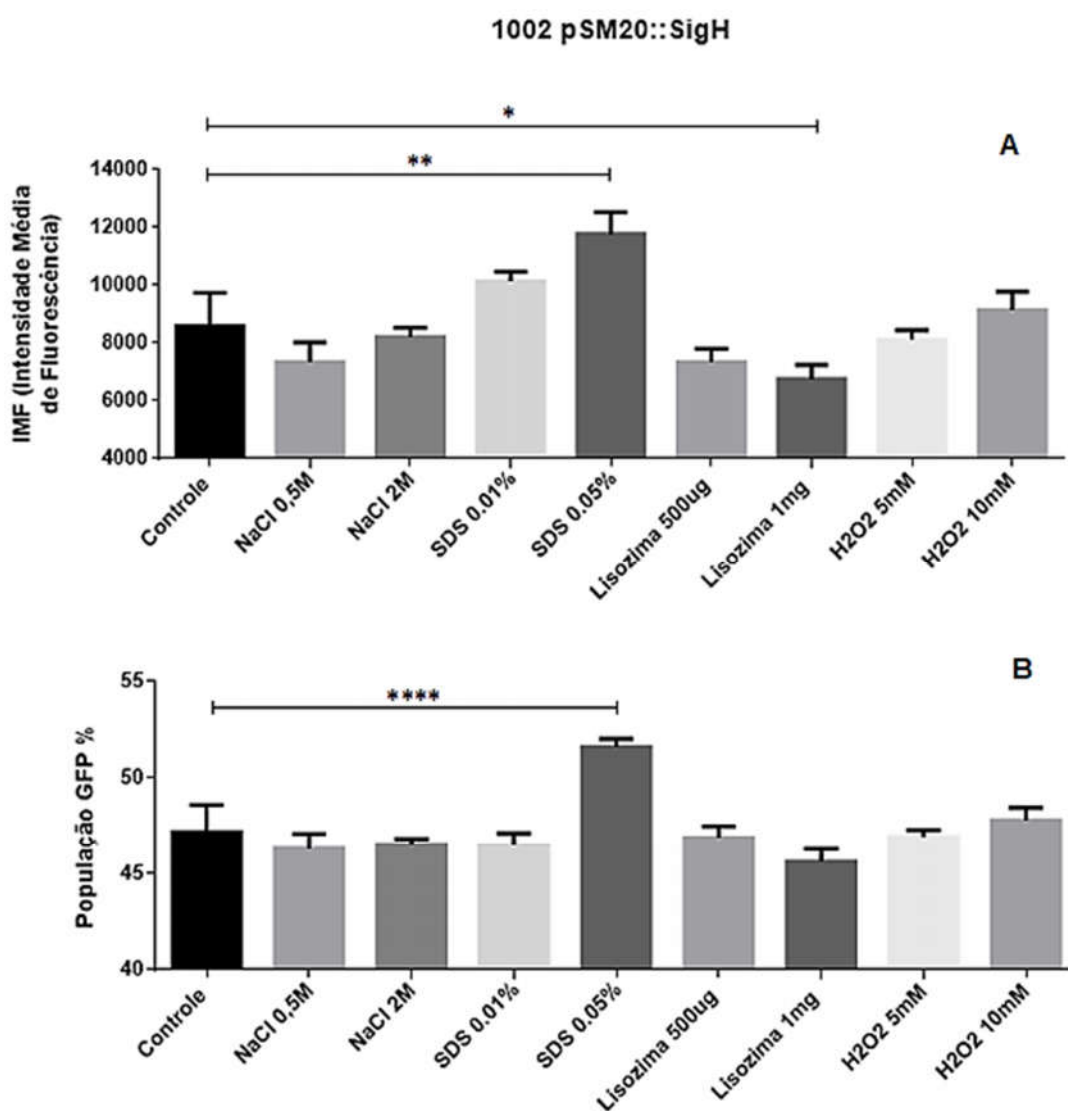


Figura 4.22. Valores de intensidade média de fluorescência (IMF) e frequência de células produtoras de GFP, após submissão da linhagem 1002 pSM20::P_{sigH} às condições de estresse. **A-** IMF após exposição da linhagem aos estresses; **B-** Frequência populacional produtora de GFP após exposição da linhagem aos estresses. As diferenças são significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (One-Way ANOVA e Tukey).

4.2.6 Indução da região promotora do gene *sigC*, *sigK* e *sigM*

Para as linhagens contendo as construções pSM20::*P_{sigC}*, pSM20::*P_{sigK}* e pSM20::*P_{sigM}* não foram observadas frequência populacional relevante referente à produção da proteína GFP em nenhuma das condições de estresse testadas neste estudo (Figura 4.23). De toda população bacteriana para essas construções, apenas cerca de 0,2 % dos eventos se encontraram dentro do *gate* selecionado para população produtora de GFP. Esse resultado indica que esses estresses não foram capazes de ativar a região promotora dos genes *sigC*, *sigK* e *sigM*, não havendo, portanto, indução da produção dessa proteína. Outros ensaios serão realizados com a linhagem 1002 contendo as construções pSM20::*P_{sigC}*, pSM20::*P_{sigK}* e pSM20::*P_{sigM}* expostas a outras condições de estresse, como estresse ácido, alta e baixa temperatura, alcóolico, escassez de nutrientes, entre outros, para avaliar o perfil de ativação da região promotora desses genes.

O papel dos fatores transcricionais σ^C , σ^K e σ^M na regulação gênica de *C. pseudotuberculosis* ainda não foi completamente elucidado (Tabela 1.1). Em *M. tuberculosis*, o fator σ^C está relacionado a diversas funções como o crescimento exponencial, resposta geral a estresses e também desempenha papel importante na letalidade de camundongos infectados (MANGANELLI et al., 2004). Na bactéria *C. glutamicum* o gene *sigC* aparenta ser essencial para a viabilidade celular, já que a tentativa de obtenção de linhagens deficientes para o fator transcricional σ^C não teve sucesso (YUKAWA et al., 2007).

Estudos em *C. pseudotuberculosis* demonstraram que o número de transcritos do gene *sigC* é aumentado após exposição aos estresses ácido e oxidativo, e diminuído após exposição aos estresses osmótico e térmico (CASTRO, 2013; PINTO et al. 2014). Além disso, Domingueti (2011) demonstrou que uma linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator σ^C é mais susceptível aos estresses oxidativo, térmico e osmótico, sugerindo que o fator σ^C tenha envolvimento na resposta a esses estresses ambientais nessa bactéria. Neste trabalho *C. pseudotuberculosis* foi exposta às concentrações de 5 mM e 10 mM de H₂O₂, diferente da concentração de 40 mM na qual foi observado aumento da transcrição do gene *sigC* por Castro (2013). É possível que as concentrações utilizadas neste estudo não tenham sido suficientes para a ativação da região promotora do gene *sigC*. Ensaios com a linhagem pSM20::*P_{sigC}* exposta às condições de estresse ácido e térmico serão realizados no futuro para observar a indução da região promotora do gene codificador do σ^C em resposta a esses estresses.

O fator transcricional σ^K está relacionado com a expressão de duas proteínas antigênicas de *M. tuberculosis*, MPB70 e MPB73, cuja produção é induzida apenas durante infecções em macrófagos (SACHDEVA et al., 2010). Em *M. bovis* a expressão dessas proteínas imunogênicas é reduzida em linhagens contendo mutações no códon iniciador do gene *sigK*, o que leva a uma virulência reduzida dessas linhagens (CHARLET et al., 2005). O papel do σ^K em corinebactérias ainda precisa ser elucidado, porém, a ausência desse fator transcricional na bactéria de importância biotecnológica *C. glutamicum* sugere que ele possa estar envolvido na virulência de bactérias patogênicas como *C. pseudotuberculosis*. No estudo de análise de expressão diferencial de genes de *C. pseudotuberculosis* em resposta aos estresses osmótico, ácido e térmico realizados por Pinto et al. (2014), a taxa de expressão do gene *sigK* não foi alterada. No estudo de Castro (2013) foi observado que a transcrição do gene *sigK* é aumentada após 15 minutos de exposição ao estresse gerado por 40 mM de H₂O₂ na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. Porém, nesse trabalho a região promotora desse gene não foi ativada nas concentrações de 5 mM e 10 mM. Outros estudos serão necessários para o melhor entendimento do σ^K na regulação gênica dessa bactéria.

Assim como para as linhagens contendo as regiões promotoras dos genes *sigC* e *sigK*, a linhagem 1002 pSM20::*P_{sigM}* não apresentou indução da região promotora em nenhuma das condições de estresse testadas (Figura 4.23). O σ^M foi relacionado com a resposta aos estresses de temperatura e oxidativo em algumas actinobactérias. Em *C. glutamicum*, a ativação do gene *sigM* foi observada na fase estacionária de crescimento após estresse térmico e oxidativo (NAKUNST et al., 2007). Em *M. tuberculosis* o gene codificador do fator transcricional σ^M só apresentou aumento significativo de expressão diante do estresse térmico, também na fase estacionária.

Em *C. pseudotuberculosis* Castro (2013) observou que na linhagem 1002 a transcrição do gene *sigM* é ativada após 270 minutos de exposição ao estresse oxidativo gerado por H₂O₂ na concentração de 40 mM. Os dados para a ativação do gene *sigM* na literatura indicam que esse fator sigma possivelmente tenha papel na adaptação em resposta a estresses em uma fase mais tardia de crescimento. É provável que o estresse aplicado em cultura no início da fase exponencial de *C. pseudotuberculosis* não tenha induzido a região promotora do gene *sigM*, e conseqüentemente não foram observadas diferenças na IMF dessa linhagem após a exposição ao estresse. Ensaio futuros com diferentes concentrações de agentes estressores e tempos de exposição distintos poderão fornecer mais informações sobre a indução da região promotora

desses genes, o que trará um melhor entendimento do papel dos fatores transcricionais sigma na resposta regulatória de *C. pseudotuberculosis* diante estresses abióticos.

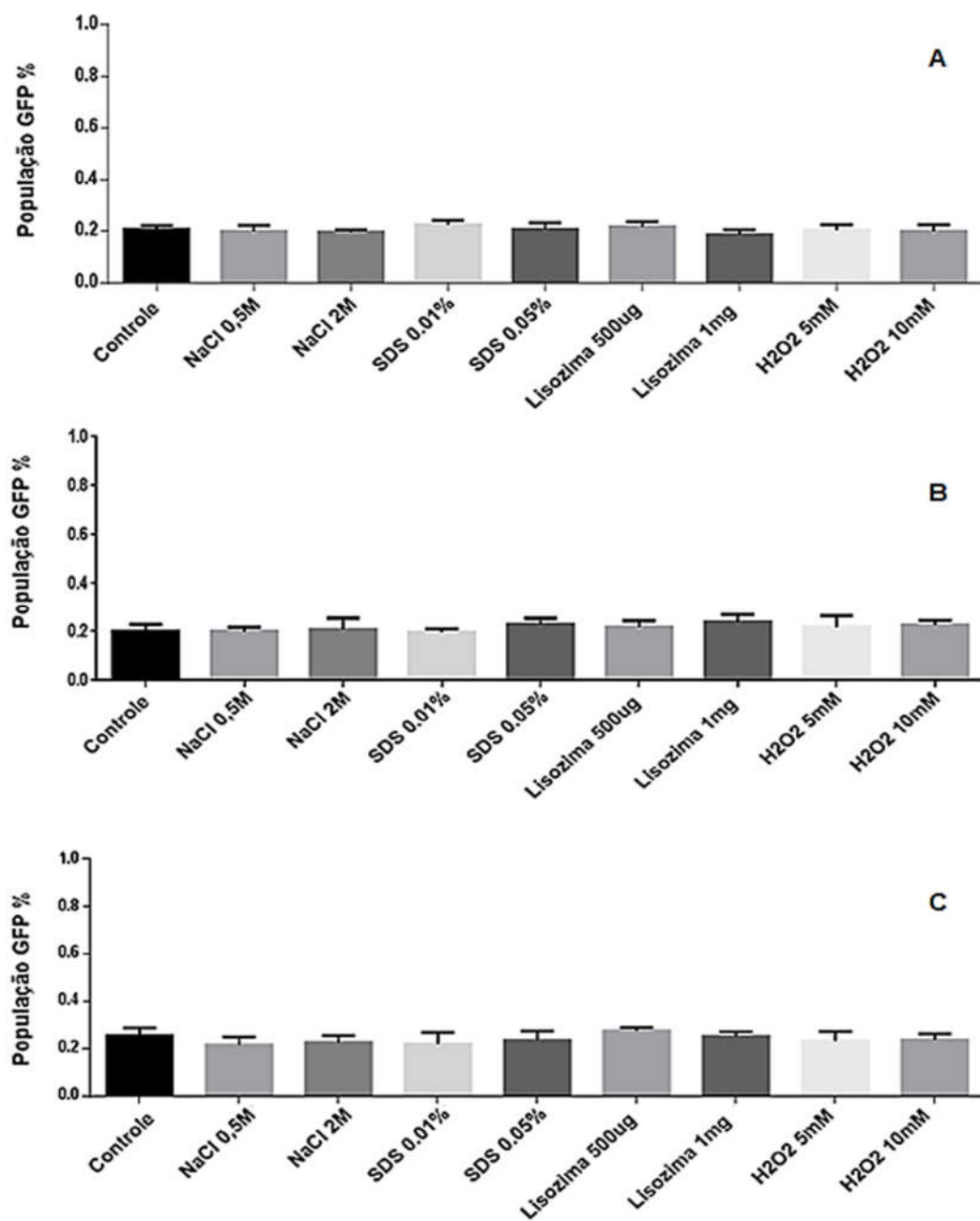


Figura 4.23. Valores de frequência populacional produtora de GFP após estresses realizados com as linhagens 1002 pSM20::P_{sigC}, 1002 pSM20::P_{sigK} e 1002 pSM20::P_{sigM}. A- Frequência populacional produtora de GFP da linhagem 1002 pSM20::P_{sigC}; **B-** Frequência populacional produtora de GFP da linhagem 1002 pSM20::P_{sigK}; **C-** Frequência populacional produtora de GFP da linhagem 1002 pSM20::P_{sigM}.

A Figura 4.24 mostra um panorama geral de todos os resultados obtidos a partir da avaliação da indução diferencial de GFP pelas regiões promotoras dos genes codificadores dos fatores σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M de *C. pseudotuberculosis* em resposta a condições adversas através de citometria de fluxo.

	σ^A	σ^B	σ^C	σ^D	σ^E	σ^H	σ^K	σ^M
NaCl a 0,5 M								
NaCl a 2M	Verde			Verde	Vermelho			
H ₂ O ₂ a 5 mM				Verde				
H ₂ O ₂ a 10 mM				Verde				
Lisozima a 500 μ g								
Lisozima a 1 mg						Vermelho		
SDS 0,01 %	Verde	Verde		Verde	Verde			
SDS 0,05 %	Verde	Verde		Verde	Verde	Verde		

Figura 4.24. Panorama geral dos dados obtidos para indução diferencial de GFP pelas regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma. A indução diferencial da produção de GFP pelas regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* diante diferentes condições de estresse foram dispostas nos quadrados, os quais foram preenchidos por cores representativas em relação à condição controle correspondente. A coloração verde indica indução da produção de GFP, enquanto que a cor vermelha indica diminuição da produção de GFP sob o controle da região promotora. Quadrados em cinza representam a ausência de variação significativa da produção de GFP na condição considerada.

5. Conclusões e Perspectivas

O presente trabalho permitiu a identificação das possíveis regiões promotoras dos genes codificadores dos oito fatores sigma de *C. pseudotuberculosis*, σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M , e as clonagens dessas regiões à montante do gene *gfp* no plasmídio repórter pSM20 foi realizada e confirmada com sucesso. Diferentes ensaios *in vitro* foram realizados para a indução dos estresses osmótico, oxidativo e de superfície celular induzido por lisozima e SDS em diferentes concentrações.

A região promotora de *sigA* (gene codificador do fator σ^A) foi ativada após os estresses osmótico e de superfície celular gerado por SDS. Apesar de ser descrito como regulador de genes *housekeeping*, os resultados deste trabalho sugerem que, em resposta a determinadas condições ambientais, o fator σ^A de *C. pseudotuberculosis* pode estar exercendo a função de fator sigma alternativo. Por outro lado, o fator σ^B é considerado um fator sigma alternativo de resposta geral ao estresse. Porém, de forma similar a estudos anteriores envolvendo *C. pseudotuberculosis* e outras bactérias proximamente relacionadas, neste estudo somente o estresse gerado por SDS foi capaz de induzir a produção de GFP, e outras condições de estresse como estresse ácido, alcoólico, térmico poderão ser avaliadas no futuro.

A região promotora do gene *sigD* apresentou ativação após estresse osmótico, oxidativo e induzido por SDS, sugerindo a existência de um conjunto de genes ativados por σ^D e envolvidos em diferentes mecanismos de resposta a estresses. Ambas regiões promotoras dos genes *sigE* e *sigH* foram induzidas por SDS, mas apresentaram redução de ativação após os estresses osmótico e induzido por lisozima, respectivamente. É possível que diante tais condições ambientais os genes precisem ser reprimidos para que outros genes possam atuar na resposta a esses estresses. Para as regiões promotoras dos genes *sigC*, *sigK* e *sigM* não foram observadas indução da produção da proteína GFP, indicando que os genes codificadores desses fatores sigma não são ativados nas condições de estresse testadas neste trabalho.

Os diferentes perfis de ativação da região promotora observados demonstraram que as construções são capazes de fornecer dados importantes sobre o possível papel dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* em resposta a estresses ambientais. Portanto, o uso do plasmídio repórter pSM20 para avaliação da produção de GFP por citometria de fluxo é uma ferramenta útil para o estudo da regulação gênica dessa bactéria, e poderá fornecer mais informações sobre os mecanismos moleculares e de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*.

Algumas perspectivas resultantes da realização desse trabalho são:

- realizar outros ensaios de estresse *in vitro*, como estresse térmico, ácido, alcóólico, nitrosativo, de escassez de nutrientes;
- realizar ensaios de estresse *in vitro* com diferentes tempos de exposição e em diferentes fases de crescimento, a fim de entender o papel de cada fator sigma de *C. pseudotuberculosis*;
- realizar RT-PCR para avaliar os níveis transcricionais do gene *gfp* sob controle das regiões promotoras de cada fator sigma com as linhagens recombinantes obtidas;
- realizar ensaios *in vitro* com culturas celulares de macrófagos para avaliar o perfil de ativação das regiões promotoras dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* em contato com fatores do hospedeiro.
- realizar novas clonagens restringindo as regiões promotoras encontradas à montate dos genes codificadores dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* e avaliar o perfil de ativação desses promotores individualmente.

6. Referências

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, L. et al. Survival capacity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis in different soil types from Chubut, Argentine Patagonia. **Revista Argentina De Microbiologia**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 105–109, 2017.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas.** - Portal Embrapa. 1997. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/515379/linfadenite-caseosa-recomendacoes-e-medidas-profilaticas>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

ANDREWS, S. **FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.** 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 17 maio. 2018.

BADGER, C. V. et al. Development and application of a flow cytometric potency assay for DNA vaccines. **Vaccine**, [s. l.], v. 29, n. 39, p. 6728–6735, 2011.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007.

BARKER, L. P.; BROOKS, D. M.; SMALL, P. L. The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 1167–1177, 1998.

BASTOS, B. L. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, [s. l.], v. 01, n. S4, 2012. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/corynebacterium-pseudotuberculosis-immunological-responses-in-animal-models-2155-9899.S4-005.php?aid=4644>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 63, n. 9, p. 269–272, 1986.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 65, p. 189–213, 2011.

- BERNARD, K. The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. 3152–3158, 2012.
- BERNARDINI, M. L.; FONTAINE, A.; SANSONETTI, P. J. The two-component regulatory system *ompR-envZ* controls the virulence of *Shigella flexneri*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 172, n. 11, p. 6274–6281, 1990.
- BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS microbiology letters**, [s. l.], v. 208, n. 1, p. 41–45, 2002.
- BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C. F.; ELLIS, J. A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 56, n. 3–4, p. 299–310, 1997.
- BROCKMANN-GRETZA, O.; KALINOWSKI, J. Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 7, p. 230, 2006.
- BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 57–65, 2004.
- BRUIJN, F. J. De. **Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2016. Google-Books-ID: HR6eDAAAQBAJ.
- BRUNER, S. D.; NORMAN, D. P.; VERDINE, G. L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. **Nature**, [s. l.], v. 403, n. 6772, p. 859–866, 2000.
- CALAMITA, H. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 233–244, 2005.
- CAMERON, C. M. et al. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 11–24, 1972.

CAMPAGNE, S.; ALLAIN, F. H.-T.; VORHOLT, J. A. Extra Cytoplasmic Function sigma factors, recent structural insights into promoter recognition and regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 30, p. 71–78, 2015.

CASTRO, T. L. de P. Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo. 2009. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas - Belo Horizonte, 2009.

CHARLET, D. et al. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1302–1313, 2005.

CHATURONGAKUL, S. et al. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 388–396, 2008.

CHEN, Y. F.; HELMANN, J. D. Restoration of motility to an *Escherichia coli* flhA flagellar mutant by a *Bacillus subtilis* sigma factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 89, n. 11, p. 5123–5127, 1992.

CHOWDHURY, R.; SAHU, G. K.; DAS, J. Stress response in pathogenic bacteria. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 149–160, 1996.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], v. 128, n. 11, p. 2503–2509, 1982.

COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC research notes**, [s. l.], v. 4, p. 243, 2011.

CRAIG, J. E.; NOBBS, A.; HIGH, N. J. The extracytoplasmic sigma factor, final sigma(E), is required for intracellular survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in J774 macrophages. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 708–715, 2002.

CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 121–147, 1989.

DM CARVALHO et al. Expressão Diferencial de Reguladores Transcricionais da Bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* Durante Contato com Fatores do Hospedeiro. **Diálogos & Ciência**, [s. l.], 2013.

D.N, G.; S.P.S, N.; N.K, C. Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. **Indian Veterinary Journal**, [s. l.], 1985. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IN19860088809>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

DOMINGUETTI, C. P. Análise do papel do fator sigma C na resposta do *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental. 2011. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas - Belo Horizonte, 2011.

DONÀ, V. et al. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 190, n. 17, p. 5963–5971, 2008.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

DROPPA-ALMEIDA, D. et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 1091–1096, 2016.

EGEN, N. B. et al. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 1319–1322, 1989.

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 317–319, 1991.

FEKLÍSTOV, A. et al. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 68, p. 357–376, 2014.

FERREIRA, A. et al. Role of *Listeria monocytogenes* sigma(B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 2692–2698, 2003.

FERREIRA, A.; O'BYRNE, C. P.; BOOR, K. J. Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 4454–4457, 2001.

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, [s. l.], v. 24, n. 33–34, p. 5986–5996, 2006.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

GALVÃO, C. E. et al. Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 17, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609009/>>. Acesso em: 18 maio. 2018.

GARNER, M. R. et al. Sigma B Contributes to *Listeria monocytogenes* Gastrointestinal Infection but Not to Systemic Spread in the Guinea Pig Infection Model. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 876–886, 2006.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLE, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, n. 23, p. 13681–13687, 1995.

GOTTESMAN, S. Stress Reduction, Bacterial Style. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 199, n. 20, p. e00433-17, 2017.

GUIMARÃES, A. S. et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 87, n. 1–3, p. 86–91, 2009.

HANNIG, C. et al. Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 821–828, 2005.

HATZIOS, S. K. et al. Osmosensory signaling in *Mycobacterium tuberculosis* mediated by a eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 52, p. E5069–E5077, 2013.

HEGGELUND, L. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pneumonia in a Veterinary Student Infected During Laboratory Work. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567093/>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

HELMANN, J. D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Advances in Microbial Physiology**, [s. l.], v. 46, p. 47–110, 2002.

HILBERT, D. W.; PIGGOT, P. J. Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 234–262, 2004.

HIRASAWA, T.; WACHI, M.; NAGAI, K. A Mutation in the *Corynebacterium glutamicum* ItsA Gene Causes Susceptibility to Lysozyme, Temperature-Sensitive Growth, and L-Glutamate Production. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 10, p. 2696–2701, 2000.

HODGSON, A. L. et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 2900–2905, 1992.

HODGSON, A. L. et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**, [s. l.], v. 17, n. 7–8, p. 802–808, 1999.

HODGSON, A. L. M. et al. Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. [s. l.], v. 62, p. 6, 1994.

HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT e WILLIAM ST. Regular, nonsporing gram-positive rods. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. In: 9Th. ed. Baltimore: The Williams e Wilkins Co., 1994. p. 565–7.

HUGHES, K. T.; MATHEE, K. The anti-sigma factors. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 52, p. 231–286, 1998.

IHSSEN, J.; EGLI, T. Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. **Microbiology (Reading, England)**, [s. l.], v. 150, n. Pt 6, p. 1637–1648, 2004.

IKEDA, M. et al. Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 2806–2808, 2009.

JAKOB, K. et al. Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 189, n. 15, p. 5582–5590, 2007.

JOLLY, R. D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 141–147, 1965.

JONES, T. C. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000.

JORDAN, S.; HUTCHINGS, M. I.; MASCHER, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 107–146, 2007.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 527–543, 2005.

KUMAR, J. et al. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan, India. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 1319–1322, 2012.

KURIA, J. K. et al. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. **Veterinary Research Communications**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 89–97, 2001.

LACASTA, D. et al. Vaccination schedules in small ruminant farms. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 181, n. 1–2, p. 34–46, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 224, p. 164–175, 2014.

MANGANELLI, R. et al. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 715–724, 1999.

MANGANELLI, R. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 423–437, 2001.

MANGANELLI, R. et al. σ Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 4, p. 895–902, 2004.

MANGANELLI, R. Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. MGM2- 0007–2013, 2014.

MARTIN; CIULLA & ROBERTS. Osmoadaptation in archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 1815–1825, 1999.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology (Reading, England)**, [s. l.], v. 153, n. Pt 7, p. 2203–2211, 2007.

MCKEAN, S.; DAVIES, J.; MOORE, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 7, n. 13, p. 1352–1363, 2005.

MCNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 921–930, 1994.

MECSAS, J. et al. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. **Genes & Development**, [s. l.], v. 7, n. 12B, p. 2618–2628, 1993.

MITCHELL, G. et al. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 18–27, 2010.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine: Revue Canadienne De Medecine Comparee**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 206–208, 1982.

NADON, C. A. et al. Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 7, p. 3948–3952, 2002.

NAKUNST, D. et al. The Extracytoplasmic Function-Type Sigma Factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 Is Involved in Transcription of Disulfide Stress-Related Genes. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 189, n. 13, p. 4696–4707, 2007.

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 491–505, 2006.

NEŠVERA, J.; MIROSLAV, P. Plasmids and promoters in Corynebacteria and their applications. In: **Burkovski, A. Corynebacteria: genomics and molecular biology**. United Kingdom: Caister Academic Press, 2008.

ORAM, D. M.; JACOBSON, A. D.; HOLMES, R. K. Transcription of the contiguous sigB, dtxR, and galE genes in *Corynebacterium diphtheriae*: evidence for multiple transcripts and regulation by environmental factors. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 188, n. 8, p. 2959–2973, 2006.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, [s. l.], v. 4, p. 2, 2008.

PACHECO, L. G. C. Caracterização do exoproteoma basal e variante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a relação com a virulência reduzida de uma linhagem mutante para um fator sigma alternativo. 2010. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas - Belo Horizonte, 2010.

PAGET, M. S. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. **Biomolecules**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1245–1265, 2015.

PAGET, M. S. B.; HELMANN, J. D. The sigma70 family of sigma factors. **Genome Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 203, 2003.

PARK, S. T.; KANG, C.-M.; HUSSON, R. N. Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 35, p. 13105–13110, 2008.

PARK. *Corynebacterium glutamicum* sigmaE is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. **Microbiology (Reading, England)**, [s. l.], v. 154, n. Pt 3, p. 915–923, 2008.

PASTVA, A. M.; WRIGHT, J. R.; WILLIAMS, K. L. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 252–257, 2007.

PÁTEK, M.; NEŠVERA, J. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 154, n. 2–3, p. 101–113, 2011.

PINTO, A. C. et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 15, p. 14, 2014.

PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 212, n. 11, p. 1765–1768, 1998.

PRICE, C. W. et al. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 757–774, 2001.

RADOSTITS, O. et al. Doenças causadas por bactérias. **Clínica Veterinária**. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RAMAN, S. et al. Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 19, p. 6605–6616, 2004.

RIBEIRO, D. et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 45, p. 28, 2014.

RIBET, D.; COSSART, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 173–183, 2015.

RODRIGUE, S. et al. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 926–941, 2006.

- ROHDE, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 219, p. 37–54, 2007.
- SACHDEVA, P. et al. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 277, n. 3, p. 605–626, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli* Using Calcium Chloride. **CSH protocols**, [s. l.], v. 2006, n. 1, 2006.
- SANTANA-JORGE, K. T. O. et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 15, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4869379/>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- SANTOS, E. M. S. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with promising potential for caseous lymphadenitis vaccine development: a literature review. **Caderno de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 90–99, 2016.
- SCHUMANN, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 549–557, 2007.
- SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 50–55, 2010.
- SHEN, W. et al. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. e0163962, 2016.
- SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 49–71, 2002.
- SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. **Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies**, [s. l.], p. 61–78, 2011.
- SONG, T. et al. RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 949–959, 2003.

SONGER, J. G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 223–226, 1988.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 156–161, 1997.

SORENSEN, G. L. Surfactant Protein D in Respiratory and Non-Respiratory Diseases. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 5, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00018/full>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

SOUZA, B. M. et al. σ ECF factors of gram-positive bacteria. **Virulence**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 587–600, 2014.

STAROSTA, A. L. et al. The bacterial translation stress response. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 1172–1201, 2014.

TANIGUCHI, H. Exploring the potential of sigma factors for strain development in *Corynebacterium glutamicum*. [s. l.], 2016. Disponível em: <<https://pub.uni-bielefeld.de/publication/2903682>>. Acesso em: 28 abr. 2018.

TAYLOR, W. E. et al. Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Cell**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 371–381, 1984.

TUCHSCHERR, L. et al. Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e1004870, 2015.

UMER, M. et al. Caseous lymphadenitis in small ruminants: An overview on reproductive implications. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, [s. l.], v. 2, p. 23–31, 2017.

UNANIAN, M. M.; FELICIANO SILVA, A. E.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 57–62, 1985.

VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 367–378, 1996.

VOLPE, E. et al. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, [s. l.], v. 118, n. 4, p. 449–460, 2006.

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 2562–2567, 1994.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 264, n. 1, p. 182–203, 2015.

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 359–371, vii, 2001.

WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 142, p. 6–10, 2016.

WÖSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 127–150, 1998.

YUKAWA, H. et al. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. **Microbiology (Reading, England)**, [s. l.], v. 153, n. Pt 4, p. 1042–1058, 2007.

ZHANG, Z. et al. Protective Role of Surfactant Protein D in Ocular *Staphylococcus aureus* Infection. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. e0138597, 2015.

7. Apêndices

Apêndice A - Região promotora do gene *sigA*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigA* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídio pSM20::P_{*sigA*}.

```
GATGGGGCGATT CAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCC
CCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGG
CTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCTCCGGAATCAAGTAGCACTTTCTGCCGCAACATTGACCAATCATG
GATCAATGTTGATGTTCAAAAATTATTACCAAGACCCTGGGCGGGCGTAACATCGCAGTGCTTAACGA
CGCCGATGCGGCGGGCATCGCCGAGGTAGCCTTCGGAGAAGATCAAGCTCGACGTGGTTCGCCATTT
TGCTCACTCTAGGCACTGGGATCGGTTCCGCTTTCTTATCAACGGGGTCTTATCCCCAACACCGAGTT
AGGGCACATGATCGTAGAGGGAAAGGAAGCCGAGCATCTAGCTTATCTGCAGCAAAAAGATCGCGAT
GAGTTGAGCTATTCAAATGGGCAAGCGGTTTCTAAAGTCTCAGCGAATACGAACGACTTTTTTGG
CCAGACGTTTTTATCGTAGGCGGTGGTATCTCACGAAAGCTGATAAATGGGTACCCAAACTCACTATC
GATACGCCCGTCATACCTGCAAAACTACGTAATACCGCAGGTATCGTAGGAGCAGCAATGGCGGCAGA
CCAAAATATCAGGCCTTAGCGCATCACAAAACCTACCGAATTCTAGAGGGGACGTTACTCTAAAATCC
GTTGCTTTTTACAAGTAACGCCCTCAAACCCCCGCAATCTCCTTAAATGTTTTATAATGGCGCTTTGTC
CAAGTCGTAATTAGTAAAAATGCCTGGGAACCTCCTCGTCCGACCTCCAGTTCTCTGCGTCTTCCGC
CTGTTGCGCTTATTCAAGTGCACATGTTAGGCAGGGGAACAATAATGAGGTTTTGACGTTAAAGCTT
CCATCGGGTCTAACACTCTAGACTGATAAGACAACCTTGTCTCCAAGTCTTAGTTGGCATAGATCTTT
TTACGAGGAAACTCACTCATCCAATCGAAAGGGCGTACGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACT
ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAAT
GGGCACAAATTTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATT
TATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACTTATGGTGTTCAAT
GCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATG
TACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAA
GGTGATACCCCTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGG
CACAAATTGGAATACAACATAA ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATC
AAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA
AATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCCACACAATCTGCCCTTC
GAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACAC
ATGGCATGGATGAACTATACAAATAA ACTAGTGGCGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGA
TGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCA
GTCGAAAGACTGGGCCTTTCTGTTTTATCTGTTGTTTGTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCC
```

Apêndice B - Região promotora do gene *sigB*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigB* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídio pSM20::P_{*sigB*}.

```
GTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATT CAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTT
CACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCCCCCCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGCAGCTGACG
TCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCC CTCACCCCATCGATTCTATG
TCGGAGATGAGATTCAAGAGCATTTTGTAAAGAATGGAATGGCTTCGAAATAAAGACGCGGAGGCCATT
TTAGATGCGCAGTATTATTTGCGCCCTGGTGTAGCCAAAGAAGATATTTCTACTACTGATATACAAGCA
GGCATGGGTTTTGCATCGACGGTGCTTCGTTTAAACCCGAACCGATGGTTTACGCTTTAGCCACGAGGTG
GATCAGCATATTGCTGCTATTATCGCCGGATTACATCCAGCGGGACTGTCTCTACGCGAAGTCGCAGAA
CTTTATGCTTTTAGCAATGGCCTTGAGGAGGATTCCCTCTATACGGAGCTCATCCAACCAATCGTCGCTC
TCATCCAGCATGGGATCATCTCCCCGAGATATCACAACCGGTTGGTAATTAATGCGCGCAGTTCTC
ATAAGAGTAAGTTTCGGCATCCGTCTCCGTAGACGGCCACATCGTGGGCAGCATTGACGCTCCAAATAC
AGGAGGGATACTCGCACTAGTAGGTGTAGGAAGAAACGACGCCCTGATGCATGGAAGACAATGGCC
CGAAAAATTGCGGAGCTTCGCATCCTCGAAGGAGAAAAGAGTGTTCGACGCAATGCTCCTGTTCTT
CTAATTAGCCAGTTCACGCTCATGGGAGCTACTGCTAAAGGCCGGCGACCTTCATGGGTGGAAGCAGC
TCCTGGAAAAAGAAGCAGAACCCATCATTGAAAAAATTGCTGCAGCATTAAAGCAACGCGGAATACAGC
TGGAGGAAGGCCAATTTGGGGCAACGATGGAGGTTGCCTCTGTTAACCAAGGACCTTCACTGTGATA
GTGGATTGTTGATTTACCCAAAAAGGTTACCTAATTGCACGCTTCGGGGCTGAAAGATAACCCCAAGT
TAATTCATTGAAGGAAAACGGGAACTTTCTGAGAAGGTTTTCCGTTGAGTTCATAGAAGCGCCGACTT
GAGGAGGTCATGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACT ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA
CTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAG
AGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTG
TTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATG
AAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAAGAACTATATTTTCAA
GATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGA
GTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACCTATAACTC
ACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACA
ACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTG
TCCTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCAACGAAAAGAGAGA
CCACATGGTCCTTCTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATA
AACTAGTGGCGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCG
AGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTA
TCTGTTGTTTGTCCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCG
```

Apêndice C - Região promotora do gene *sigC*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigC* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigC*}.

```
CTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTAGGCCTGGTATGAGTCAG
CAACACCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCCCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTG
TGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTCTGCCGGCGCATGCGATATCGCC
TCGCGATGATGGTCGGCATTCTTACCAGCCATCTCTTGAGCCTCAGCATCAGTAAAGGTATCCCAGCCCT
GACGGGACTTAAAGTGATACTTAACCCATACCGGCTTACCCTCCTCATTGATCCACTGGAAGGTGTGAG
AACCAAAGCCATCCTGGTGGCGAGAAGTCTTAGGGGTACCGCGATCACCCATGAGGTAGGTCACCTGG
TGCGCAGACTCAGGAGTACGGGTCCAGAAGTCCCACTGCATATCCGCATCCCGGAGCCCATTACGGCC
TAGACGCTTCTGAGAGTGGATGAAATCCGGGAACCTAATGGCGTCGCGCAGGAAGAAGGTGGGGGTG
TTGTTGCCACGATGCATAGTTACCATCCTGGGTCCAGAAACGTAGAGCGAATCCGTGCACGTCACGC
CAAGTATCCGGGGAGCCCTGCTCGCCAGCCACCGTGGAGAATCGGATAGCCATCGGGGTGACAGTGC
CCTTTTGAAGAGCTTAGCCTTGGTGTATGCCGATACATCCTCAGTGATGTGCAGCTACCAAAGGCGC
CGTGGCCTTAGCGTGGGGATTGCGCTCTGGGACGCGCTCGCGGTTGAAGTGAGCGAGCTTCTCAATC
AGGTGGAGGTATTGAGAACATTAGCCCCCTGAGGTCCCGCAGTGATGGAGATGTTCTCGCTAGGAAC
CGGCTGGCCACCTTCGCGTGTGTGTAAGCAACAGTTTCAAGTGCCTCTCCGGCGCCGAGAATGGGAT
CGACTGGTGAGTTCATGAAAAATCCCTCCTTAAAGGGCTGGCTTTGGAGTGGGTCTTAACTTAAAAAT
AACCTTACATTGAAAATAAAACCTTGCAACAGATTTTATTGAGAGGTTACCTTACAACCTTAGTTTA
GGTGGTAAAGTCCTTAGTTCTCTGATTTAAGAGGAGTATACTATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTCACT
GGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAG
GGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTT
CCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGA
AACAGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAAGAACTATATTTTCAAAG
ATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAG
TTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAAATCA
CACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAAATTAGACACAAC
ATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCAATTGGCGATGGCCCTGTC
CTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACC
ACATGGTCCTTCTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAA
CTAGTGGCGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTGTGGGGTCTCCCATGCGGA
GAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTAT
CTGTTGTTTGTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGA
```

Apêndice D - Região promotora do gene *sigD*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigD* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigD*}.

```
GATGGGGCGATT CAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCC
CCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGG
CTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCACGCTAAGGTCGGCGTCAACGCTTTGGCCAATGCCTTGAGCAAGC
CTGCTTATTGGATCGCCGACAACGCAGGTCTCGACGGTGCAGTTGTGGTCTCTAAGATCGCTGATTTGC
CTAACGGGGAAGGCTTCAACGCTGCAACTTTGGAGTACGGGAACCTGATTGAACAGGGCATTATTGAT
CCTGTAAGGTCACCCACTCTGCAGTGGTGAACGCAACCTCCGTTGCCCGGATGGTTCTGACCACCGAG
GCATCTGTTGTGGAGAAGCCTGTTGAGGCTAAGCCACAGGCTGGTGGGCATCACCACCACCATCACC
CTAGAAAAATGCAAAGAGTCCCGAGCGTTGGTTTTCTGTCCATGCTCGGGACTTTTGCTATTCACGGCAA
TTGGATGATGGCTCTTTGAACAAGTTGTGGCTTAGCCGTACCTCCTCGATAGCATTGTTGCGCGTCCG
ATTCGAAAGACCTCCCATATTCCATAAGGTT CAGCGTATTGGAGAGCATGTTGCCTGCAATTCCTCA
GCACCGGACACAAGGAACAAATTTCTTTGCTGGCGTTCACGGGACCGTCTAGCCAGACCCCGTTTCG
CCTCGGGGTGATAAAAAATTTCCGACTGGGTTCCCTGCATGCTCCGTGCAATTGCCAATCCATAACT
GGGTTTGTGGAGCCGTAATAGGTCGGTGTGTTTCATATGAAGGGTAATTCCTTATATCAATGGTATGT
GGTGGGTAGAAAAGCAGACTCTGAACATGAGGAAGCTGCGTTTTTGATTGTGCGGGCGTGAAGTAAA
CAAGGCATGGACGCGGAGGGGAAGAGAGGGAAAAATCTGGAAAAATCGTCGATTCTTCCAGAACCG
CCGCTACCACTAAAGTTGATAACTGAGGCTATGTCCAGGTATTATTTACTTTTTGTATCGTTGGACAAT
TCGGTAATTCTGATTCGGGCTGCAAGTACTGCCGATGATCGTGCTTAGACGGTCCGATTCTAAGGATCC
TCTAGATTTAAGAAGGAGATATACTATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCT
TGTTGAATTAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGT CAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA
CATACGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGT
CACTACTCTGACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTG
AAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTCAAAGATGACGGGAAC TACAA
GACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATT
TAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAAC TAACTCACACAATGTATACATCAT
GGCAGACAAAACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAAT TAGACACAACATTGAAGATGGAAGCG
TTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCA
TTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGA
GTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA ACTAGTGGCGCCGAAC
TCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAC TGCC
AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTG
AACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAG
```


Apêndice E - Região promotora do gene *sigE*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigE* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigE*}.

```
GCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTGAGCCTGGTATGAGTCA
GCAACACCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCCCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCT
GTGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCCAAATTAG
TCCCGGTGGCGTGGTTGTCGTAGGCAAAAACCAAGTGGTCTAAAAAGACCACACGACTGGGTGTGCG
GCTCTACAAGACCACGCACCCAGTTTTACTTTTTGGTACCAACGTGATGCCAGCCCTAATGGGAGAC
GCGCGACGATCACGTTATCAAGGGAAGAAATGACTCGTCTGCTTCCCTCGCTGCGACGGTGTCTCGAT
CCTTCTAGTGGCGTCGGAAGCGTGCCGTCGAGCAATGAATCCGCGAGGACCAATACTCCGCCGGTG
GATAGGAGGGGGAGAGCCGCGTCAGTGAAGGCTTTAAGGTCTACAGGCGAGACTTCCCCGTAACGA
TTTGATAAGAATCAGTGGCCAGCCGTCCATAACATCGAGCGGACGAGAGGGCAGGAATCGAATACG
CGATGGGGAGTAACCTGCTTCGCGAACGTGTGTTTCGCTCGTTTTGATGCTCCGGTTCAGGATCAAT
ACACGTTAAGATCCCAGAGTCACTCAAACCGCAAGAAGATGAAGCCCAACGACGCCGGCGGCAGGG
GTAAGTGCATAGCCCCCTGCGCACGTGCGGTGGCCGCTAGCGTGGTTAGGAGGGTGCCCGTACCCTG
ATCGGGGAGCGCAAGGCCAAACTCTTGTGCATCTTCGAAGCGGCAGCGAGGACATCGCCTACGATGG
CGGTCGACTCAATGTAATCGCGGAGATAATCGTTAGAAGCATTACAGTGGCTAAGTTTAGGTA AAAAC
GTCAGAGAAATAGCGCATAACGCGCAGGTTGTGACATCTGTGGCGCATGGGAATTGTTATCAGAAACT
GTATTTGATCACGATTTGAGAAAAGATTGATTTTGACAGCGTTTTTCCAGACTTCTAGCTGGTTTTCCC
AGAAGAGTCGGGCAAATACTTTGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACTATGAGTAAAGGA
GAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTT
CTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTG
GAAAACACTCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATA
CCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAA
CTATATTTTCAAAGATGACGGGAACACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTG
TTAATAGAATCGAGTAAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAAT
ACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCA
AAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTG
GCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAA
CGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGTGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATG
AACTATACAAATAA ACTAGTGGCGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGG
GGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAAGACT
GGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGG
```

Apêndice F - Região promotora do gene *sigH*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigH* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigH*}.

```
GATGGGGCGATT CAGGCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCC
CCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGG
CTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCGTGCCGCCTTTGCTTCTCGACGCTGCCTCATACCTTTGGACGGCTAT
TACGAGTGGCATAATAAACAGCCTTATTGGATCACAAACCGGATCGGTAGTCTGGGTAGCTGGTCTTTGG
GACTCCGGGGCGCAACAGTTATCGGCCACGATGATTACTACGGATTCGCGTCCGCCGTTAGACCGAGT
GCATCATCGCATGCCACGCTTTCTATCGGAAGATGAGTTCACGATGTGGCTACAGGGAAGTCCAGATCA
AGCAGCCAGCCTGTTGATTCCGGGCGACGCCAGCGCTTTTTCCCTTACCCCCCGGATAAGGCGGTGG
GGAACATTCGAAACGATTACCCGGAGCTAATCGGCTTGAACGTCGACAAGCTTCCCATCGACGAGTGA
CGCAAGCGATTCCGCGCTGAGTCTACGTCTAAGCCGCGTCGTCGCCGGAACAAAGATCGTGTCAA
AAAGAATCGCGGTTTCATCAATAACGGTGGGCAGCACAGTTTTTTGTCCGAGGGGCGAGATAACGCCG
GGGATGTACCCGGAGGATTTTGAGGCGTCGTGAGGATCGGCCATCGTTCGCTTTGGATGCGCCAAGAGC
CGCGGCGACCTTTTTTAAACTTAATTGGGAGGTGACAGGCACGCATGCCACCGCTAGTTGGCGCTTGG
GTCTTTCCAGCAGTGAGATCAACAACACTAGGGTTTTAAAGATGCGTTCGGGTTCCACTCCTAGTGCCG
CTGCAGCATGATCGCCAAAATGCTCGGTTCCACCTTCAAAAAGTACGACCTTATAGTCCACGTCGGATG
AAGCCAGCACCGCCAGCGCGGGTGTGCTGCCGAATGCTTCTTACTCACGGGGTACCTCCTACTAG
ACTTGATAGTGTCCAATTCTAAGGAGATCAGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACTATGAGTAA
AGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAA
ATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCAC
TACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAA
GATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAA
GAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACC
CTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAAACATTCTTGGACACAAATTG
GAATACAACATAAECTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAAC
TTCAAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCA
ATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAAGATC
CCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATG
GATGAACTATACAAATAACTAGTGGCGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTG
TGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAAGGCTCAGTCGAAAG
ACTGGGCTTTCTGTTTATCTGTTGTTTGTGCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAG
```

Apêndice G - Região promotora do gene *sigK*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigK* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigK*}.

```
GATGGGGCGATT CAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCC
CCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGACGTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGG
CTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCAGAGCAAAAATGAGCAGTGAAGGCTTGCCTATGGCAAACGCT
ACGGTCAAGATCACCGTAGAAAAGTCCAATATCGCCAGTTGCGCCGGCAACCGTAATAGCTGCAAGAAT
CGGTCCCGCACATGGAACATACACAGCTCCAGCGCTAGGCCAATAGCAAAGCCGCTTTATTACGCGC
TTT GAGCTGTAGCGATGTTGGGCGCGGAATGCGGTTAAATGGTGCCTCGATCCAATCGCCGAGCTTAG
GCACAATCATGCCTACGCCACCAGGACCAGCAAGATAATGCCTCCCATCGCAGCACATCCTTAGGCA
ATCCAGCGCACCAAGGATCAGAGTTCACCAAAGTAATAGTGGCAAAGCTAAGGGCCAGGCCAGAA
ATCACATGGGTAGGTTTACGGTCTACGGAAACCGCCAAAACGACCGGAAGAACC GGAAGAATACACG
GAGATATACCGGTAACGATGCCACCATAAGCCCGATCAAAAATGAGTTC AAGCATGTGTGTTCTTTAT
GTGCTTTTATATTT CAGCTTTAACAATCTTTGGGAGCACGGCACCTTCTGGTTGCAACCATGCGCGCG
GCTCCCTTCGCACTCACGACGCAACAACAATGGCAGCAATGGTGCAGTGCACGAGCCGTTATTAAGAA
GTACGGAACATAAGAACTTT CAGATTGGATAATCGCAATTACACAGGTAGAAACATTGGAAGTGTAT
CAAATCAATGAAATTCACAGTTGTTTTATTTTCCAATCCAACGCACACAACAGCTCCGAAGTACTCAA
TAAGCGCGGAACATAAAAACGCGCATTGCATCAGAAACTCAGTCTTGTATAAGGAGCACTGACCTCTAG
GATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACTATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGCCCCA
ATTCTTGTTGAATTAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGA
TGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTCTGTTCCATGGCCAACA
CTTGCTACTACTGACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACT
TTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACT
ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATT
GATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGACACAAAATTGGAATACAACATAA ACTCACACAATGTATAC
ATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATAGACACAACATTGAAGATGG
AAGCGTTCAACTAGCAGACCATATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTACCAGAG
AACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTCGAAAAGATCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTT
CTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA ACTAGTGGCGCC
GAACTCAGAAAGTAAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAC
TGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTG
```

Apêndice H - Região promotora do gene *sigM*

Sequência do fragmento referente à região promotora do gene *sigM* (rosa) e a sequência codificadora do gene *gfp* (verde) no plasmídeo pSM20::P_{*sigM*}.

```
GATGGGGCGATTAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCC
CCCCCATGGTAAATCTGCGCAGACAGCCCTGTGCAGCTGACGTCTGCAGGCCCGCTAATGAGCGGG
CTTTTTTTCTTGCCGGCGCATGCAACCCCGCAATACTCCGGGCTTTGGTAGCGCTGGTTTAGCAACAT
CAGCCGTGCAATTATTGCCATAGCTGTGGCAGTTATTGTTGTCTCCGTCGCTTTGATTACTGGTTATATC
ACTAGTCTGTTTGGCAGTAGCCACGGTCAGACTCCTCTAAATAGCGATCCCATTGTTCACTCCAGGCCCT
CTGATGCATCAGAGGTTCTAGCATTGTTGCCCTATAAAAAGCGCTACTGCATGGTCACCTAGCGGCA
CAATCCCAATCGCGAATCCACGTCTACTGCACAGCTAGCTATTGATCCAGATAAATCTAGTGCTTGGTC
CACCGGGCCGCTAGCAAAGGGGCGAGGGGGCTGGTCTCCTCATTACACTTGCTCAGCCGCACCAAGCTA
GCTCGTTGTAGTAGAGAGCAATGGTATCCCGGCAAAGGTGTCTATCTACCAAGTAGAAGATCCACAT
CTTCTTCCCTGGATTCTGCTCAACTGTTAGAAGAACAAAAGGTTTCTTCTATGCAGACCCGGATTCTCT
AGATAACGAGCCGTTAGTCACCTCCATTCTGGTGTGGGTCACGGGGACCCCGACAATGCTTCTATGAA
GGTGCACAACGTCACGGTGGTAGCTACTTCTTAGCGTACTACGCAAACTGTGGTGGGAAAGAATGA
TCTATTCTTCCACCACAGTTTTCTTTTTCTTACTATAAAAACCGCAATTATCACTTTTATGCAGAACCTCA
CCTCTCAGCTCCTGTATATGCGTTTTTCGCGTATATCCATAGCGTTTTGTGGGCTACTAAAGTCACAC
CAAAAGCCATAAACCCACTTTTATACAGGTCAGAACATTAATAATCTTCTTCTGCATATCTGTAACATCC
AATTCATTGGGCAAAAAGAACATCTTGCCACGCGATTTCTTAGTCAAGATTAGACGGGAGAATTAAG
AATCACCGTGTGCTACAAAACGACACCGCAACACTATGGGGGGAAATAGGATCCTCTAGATTTAAGA
AGGAGATATACTATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGAT
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAACACT
TACCCTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTGTCACTACTCTGACTT
ATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC
CGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAG
TCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGGAA
ACATTCTTGACACAAATTGGAATACAATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAA
AGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCACTAGCAGAC
CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACAC
AATCTGCCCTTTCGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTG
CTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAACTAGTGGCGCCGAACCTCAGAAGTGAAACG
CCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAACGCCAGGCATCAAATAAA
ACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAG
```

