

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise transcricional de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi, linhagem 258, a partir de montagem *ab initio*: um enfoque nos processos biológicos dos *stimulons* ácido, térmico e osmótico.**

ORIENTADA: **Mariana Passos Santana**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

CO-ORIENTADORA: **Dra. Anne Cybelle Pinto**

BELO HORIZONTE

Julho 2014

**MARIANA PASSOS SANTANA**

**Análise transcricional de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi, linhagem 258, a partir de montagem *ab initio*: um enfoque nos processos biológicos dos *stimulons* ácido, térmico e osmótico.**

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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Anne Cybelle Pinto**

**BELO HORIZONTE**

**Julho 2014**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, ensinamentos;

Aos meus irmãos pela amizade, cumplicidade, paciência;

Ao meu namorado pela ajuda, paciência, carinho, desabafos, por me ensinar um dos mais lindos tipos de o amor;

Aos meus tios, tias, primos que sempre que preciso estão disponíveis, e principalmente a minha avó, uma pessoa que me ensina a viver como mais força e determinação;

Aos amigos de longa data, em especial as GATAS e aos BIODESAGRADÁVEIS por todos estes anos de amizade, por serem a família que eu escolhi;

Aos amigos do LGCM e LPDNA, uma segunda família, por compartilharem os sofrimentos e alegrias da vida acadêmica e também pessoal, e um agradecimento em especial as meninas do RNA-seq, e principalmente ao Rommel e Pablo por me aguentarem e auxiliarem nos pedidos de socorro;

A minha co-orientadora Anne, por me introduzir ao RNA-seq e me auxiliar nesta dissertação, sem ela nada disso seria possível;

Ao meu orientador e professor Vasco por me aceitar no laboratório e fazer possível meu desejo de ser cientista;

A CAPES por financiar este projeto e os dois anos de bolsa.

A TODOS, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABELAS .....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1.1. A espécie <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	5
1.1.1. Classificação taxonômica.....	5
1.1.2. Propriedades morfológicas e bioquímicas .....	6
1.1.3. Epidemiologia .....	7
1.1.4. Doenças causadas por <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	8
1.1.4.1. Linfadenite caseosa .....	8
1.1.4.2. Linfangite ulcerativa.....	10
1.1.5. Determinantes de virulência .....	11
1.1.5.1. Fosfolipase D .....	12
1.1.5.2. Lipídios da parede celular .....	13
1.1.5.3. Sistema transporte ABCD de ferro.....	14
1.2. Condições de estresse .....	16
1.2.1. Estresse ácido .....	18
1.2.2. Estresse térmico.....	19
1.2.3. Estresse osmótico.....	20
1.3. Genética e <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	22
1.3.1. Projeto Genoma .....	22
1.3.2. Tecnologia de Nova Geração.....	23
1.3.2.1. Plataforma SOLiD™.....	23
1.3.3. Transcriptoma.....	25
1.3.3.1. Projeto Transcriptoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	28
3. OBJETIVOS .....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos .....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Linhagem selecionada no estudo.....	32
4.2. Curva de crescimento da linhagem 258 .....	32

4.3. Cultivo celular de <i>C. pseudotuberculosis</i> em diferentes condições de estresse .....	32
4.3.1. Experimentos na condição de estresse térmico.....	33
4.3.2. Experimentos na condição de estresse osmótico.....	33
4.3.3. Experimentos na condição de estresse ácido .....	34
4.3.4. Experimentos na condição controle .....	34
4.4. Diluição Seriada e plaqueamento .....	34
4.5. Obtenção do material para extração do RNA total.....	34
4.6. Extração do RNA total .....	35
4.7. Remoção do rRNA.....	35
4.8. Síntese e preparo da biblioteca de cDNA .....	36
4.9. Preparo das microesferas para o sequenciamento .....	36
4.10. Análise dos dados .....	37
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Curva de crescimento <i>C. pseudotuberculosis</i> 258 .....	39
5.2. Avaliação da susceptibilidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> nas diferentes condições de estresse aplicadas .....	39
5.3. Extração do RNA total de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	41
5.4. Processamento dos dados do SOLiD™ .....	42
5.5. Análise dos softwares Blast, Blast2go e CSI.....	43
5.5.1. <i>Stimulon</i> ácido.....	44
5.5.2. <i>Stimulon</i> térmico .....	46
5.5.3. <i>Stimulon</i> osmótico .....	48
5.5.4. Comparação entre os estresses.....	49
6. DISCUSSÃO .....	50
6.1. Genes envolvidos em uma mesma rede de regulação .....	51
6.1.1. Chaperonas e genes regulados.....	52
6.1.2. Aquisição de glicina betaína como osmoprotetor .....	55
6.2. Genes descritos nos processos de “ciclo celular”, “divisão celular” e “óxido redução”.....	56
6.2.1. Divisão e ciclo celular .....	57
6.2.2. Processo de “óxido redução” .....	61
6.2.2.1. Catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, tiol peroxidase e proteína comigratoria com bacterioferritina.....	61
6.2.2.2. Tiorredoxina e tiorredoxina redutase .....	64

6.2.2.3. Proteína semelhante a ferritina e proteína de proteção ao DNA durante inanição .....	66
6.2.2.4. Biossíntese da parede celular .....	67
6.2.2.4.1. Decaprenilfosforil-D-2-keto eritropentose redutase e Decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase.....	68
7. CONCLUSÃO.....	70
8. PERSPECTIVAS .....	72
9. REFERÊNCIAS .....	73
10. ANEXOS .....	87

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Alterações bioquímicas durante fagocitose.....	17
<b>Figura 2:</b> Matrix de cores da plataforma SOLiD.....	24
<b>Figura 3:</b> Grafo de Bruijin.....	27
<b>Figura 4:</b> Curva de crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 258.....	39
<b>Figura 5:</b> Número de células viáveis em cada condição testada.....	40
<b>Figura 6:</b> RNA extraído após tratamento com DNase.....	41
<b>Figura 7:</b> RNA extraído após remoção dos rRNAs.....	42
<b>Figura 8:</b> <i>Gene Ontology</i> por processo biológico (nível 4) - <i>Stimulon</i> ácido .....	44
<b>Figura 9:</b> <i>Gene Ontology</i> por processo biológico (nível 4) – <i>Stimulon</i> térmico .....	46
<b>Figura 10:</b> <i>Gene Ontology</i> por processo biológico (nível 4) - <i>Stimulon</i> osmótico .....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Média obtida por condição.</b> Comparação da média obtida pelos controles e cada estresse.....	40
<b>Tabela 2: Dados brutos do sequenciamento.</b> Condições ácida (pH), térmica (50°C), osmótica (2M), e controle (C).....	42
<b>Tabela 3: Parâmetros da montagem:</b> Condições ácida (pH), térmica (50°C), osmótica (2M) e controle (C).....	43



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Graus celsius
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>%</b>	Porcentagem
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Blast</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BHI</b>	Infusão Cérebro-Coração
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i>
<b>CMNR</b>	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus</i>
<b>Cp</b>	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
<b>CSI</b>	CoreStlmulon
<b>dcw</b>	<i>Division and cell wall</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>FAD</b>	Fosfodinucléotido de nicotinamida e adenina
<b>Fe</b>	Ferro
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GOLD</b>	Genomes Online Database
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidróxido de hidrogênio
<b>HSP</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>LC</b>	Linfadenite caseosa
<b>LGCM</b>	Laboratório de Genética Celular e Molecular
<b>LU</b>	Linfangite ulcerativa
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>N50</b>	Medida estatística para avaliar a qualidade de um conjunto de “contigs” gerados por montagem ab initio
<b>NAD</b>	Dinucléotido de nicotinamida e adenina

<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>O</b>	Oxigênio
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>OSD</b>	<i>Oedematous Skin Disease</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PF</b>	<i>Pigeon fever</i>
<b>pg</b>	Picograma
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PLD</b>	fosfolipase D
<b>PPI</b>	Interação proteína-proteína
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNA-seq</b>	Sequenciamento do ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucléico ribossômico
<b>SNP</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>SOLiD</b>	<i>Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection</i>
<b>TCA</b>	Ciclo do ácido tricarbóxico
<b>TEA</b>	Tolerância ao estresse ácido
<b>tRNAs</b>	Ácido ribonucleico transportador
<b>TSS</b>	Sítio de início da transcrição
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria patogênica, responsável por diferentes patologias, que trazem grandes prejuízos à agropecuária, como linfangite ulcerativa. Esta doença se manifesta, principalmente, em equinos infectados pela linhagem 258 de *C. pseudotuberculosis* (biovar *equi*). Com o objetivo de melhor compreender a biologia deste microrganismo e a dinâmica da expressão gênica no início da fase exponencial de crescimento, um estudo transcricional foi realizado. Através do RNA-seq foi possível identificar os transcritos presentes nos estresses ácido, térmico e osmótico, condições que simulam o ambiente enfrentado pelo patógeno, durante o processo infeccioso no hospedeiro, e compará-los à condição fisiológica. Assim, após sequenciamento pela plataforma SOLiD™ V3 plus, os transcritos foram montados pela metodologia *ab initio* e os dados processados no software Blast2go com atribuições GO (*Gene Ontology*). As CDSs (*coding sequences*) foram organizadas dentro de cada categoria e termo GO, pelo software CSI (CoreStmulon), e a categoria “processo biológico” foi selecionada para análise dos genes. Entre os *stimulons*, conjunto de genes regulados por uma determinada condição ambiental, o estresse ácido foi o que mais contribuiu para um catálogo gênico, os quais genes relacionados ao combate de espécies reativas de oxigênio, ao estresse térmico, entre outros, foram identificados. O *stimulon* térmico apresentou resultados interessantes, envolvendo as HSPs (*heat shock proteins*) como moduladoras da expressão, além de genes de aquisição de ferro e síntese da parede celular. No *stimulon* osmótico não foi possível verificar a presença de genes relevantes ao estresse, mas possíveis genes envolvidos na virulência e sobrevivência do patógeno foram descritos. Entre os genes compartilhados entre duas ou três condições, destacam-se os genes *fts*, envolvidos na divisão e ciclo celular, e os envolvidos na síntese de osmoprotetores. Os genes codificantes das proteínas MraZ, Trx, TrxR, proteína semelhante ferritina, SDH, Drp1 e Drp2, já demonstraram um papel protetor relevante em outros organismos, e por isso foram considerados os mais promissores à contribuir para soluções eficazes contra doença provocada por *C. pseudotuberculosis* e assim minimizar os prejuízos trazidos ao agronegócio.

**Palavra-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, estresses, *stimulon*, transcriptoma, RNA-seq, montagem *ab initio*

## ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a pathogenic bacterium responsible for pathologies that may cause losses to livestock. Ulcerative lymphangitis, one of these pathologies, manifests mainly on horses infected by the strain 258 of *C. pseudotuberculosis* (biovar *equi*). Aiming a better understanding of the microorganism biology, as well as the dynamic of the gene expression during exponential growth phase, a transcriptional study was realized. Through RNA-seq it was possible to identify the transcripts on osmotic stress, acidity, and heat shock, which simulate the environment encountered by the pathogen during the infection process, and compare them to the physiological condition. After sequencing through SOLiD™ V3 plus, the transcripts were assembly by ab initio methodology and data processed on Blast2go with GO (Gene Ontology) attributions. The CDSs (coding sequences) were organized in each category and GO term through CSI (CoreStimulon) software, and the “biological process” category was selected for gene analysis. Among stimulons, a group of genes regulated by a certain environmental condition, acidity stress contributed further for the genic catalog. Genes related to combat against reactive oxygen species and heat shock stress were also identified. The heat shock stimulon involved the HSPs (heat shock proteins) as expression modulators, as well as iron uptake genes and cell wall synthesis. On osmotic stimulon, it was not possible to verify the presence of genes relevant to stress, but genes that may be involved on virulence and pathogen survival were described. Among genes shared on two or three conditions, we highlight *fts* genes, involved on cell division and cycle, and genes related to osmoprotection synthesis. Coding genes of the proteins MraZ, Trx, TrxR, Dps, ferritin like protein, Drp1 e Drp2 have already demonstrated being relevant on other organisms and, therefore, they may contribute to efficient solutions against *C. pseudotuberculosis* disease and minimize livestock economic losses.

**Key words:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, stress, stimulon, transcriptoma, RNA-seq, ab initio assembly

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*

#### 1.1.1. Classificação taxonômica

A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um dos representantes do filo Actinobacteria, o qual possui 11% do total de espécies do domínio Bacteria descritas no GOLD (*Genomes Online Database*) (PAGANI et al., 2012). Este filo é considerado heterogêneo, isto ao analisar tanto a morfologia, como as propriedades fisiológicas e metabólicas, e os habitats (VENTURA et al., 2007). O mesmo pode ser dito para o gênero *Corynebacterium*, que apresenta espécies de diferentes estilos de vida, desde patogênicas como *C. diphtheriae*, agente causador da difteria (BERNARD, 2005, 2012), a não patogênicas como *C. glutamicum*, bactéria altamente utilizada na produção de aminoácidos (KALINOWSKI et al., 2003; LEUCHTENBERGER, 1996).

O gênero *Corynebacterium*, juntamente com outros gêneros deste filo (*Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) compõe o grupo CMNR (BAIRD; FONTAINE, 2007). Este é caracterizado por bactérias Gram positivas, que apresentam uma camada peptidoglicana ligada covalentemente a uma malha de arabinogalactano, além da presença de uma camada externa de ácido micólico e alto conteúdo G+C no genoma (DORELLA et al., 2006a)

*C. pseudotuberculosis*, uma das espécies deste gênero, vem trazendo grandes prejuízos ao agronegócio, e foi detalhadamente descrita pela primeira vez por Preisz em 1894. A classificação atual desta espécie a distingue em dois biovars (*equi* e *ovis*), e esta divisão é corroborada, na grande maioria, por dados filogenéticos, estudos estes que envolveram o gene 16S rRNA (RNA ribossômico) e a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (*rpoB*); produção de nitrato redutase (BIBERSTEIN et al, 1971) com endonuclease restrição (DORELLA et al., 2006a; SONGER et al., 1988).

O biovar *ovis*, também identificado como sorotipo I, foi isolado de ovinos e caprinos, e é caracterizado pela redução negativa de nitrato e por causar a doença linfadenite caseosa (LC) nos animais supracitados. Este sorotipo

também pode causar doenças em bovinos e humanos (DORELLA et al., 2006a).

O biovar *equi*, ou sorotipo II, foi isolado de equinos e bovinos, e apresenta redução de nitrato positiva. Esse é o causador de doenças em búfalos, como a doença do edema cutâneo (OSD - *Oedematous Skin Disease*); e em cavalos, como a linfangite ulcerativa (LU) e a *pigeon fever* (PF).

Pesquisas demonstraram que a separação de biovares por nitrato redutase não é capaz de explicar todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Por exemplo, observou-se que cavalos acometidos pela doença LU, foram infectados, com maior frequência, por bactérias nitrato positivo e, por uma pequena parcela, por nitrato negativo (COSTA et al., 1998). Estes autores também observaram divergências entre animais de diferentes localidades e o padrão em ensaios com enzimas de restrição, demonstrando a necessidade de estudos globais com diferentes espécies acometidas por *C. pseudotuberculosis*.

Técnicas que utilizam o DNA para genotipar os diferentes isolados de *C. pseudotuberculosis* também são amplamente utilizadas, e entre eles destaca-se o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*), método de amplificação randômico do DNA polimórfico (GUIMARÃES et al., 2011). ERIC-PCR demonstrou ser eficiente e vantajoso, comparado as outras técnicas de genotipagem, como o RAPD, e obteve um resultado favorável ao comparar linhagens de *C. pseudotuberculosis* de diferentes localidades, hospedeiros e dos dois biovares (DORNELES et al., 2014). Segundo os autores este método separou, parcialmente, os biovares *equi* e *ovis*, em diferentes *clusters*. Soares e colaboradores (2013) também avaliaram diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*, e sugeriram que o biovar *ovis* é mais semelhante entre si que o biovar *equi*, sendo portanto mais clonal.

### **1.1.2. Propriedades morfológicas e bioquímicas**

*C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular anaeróbio facultativo, que apresenta crescimento ótimo a 37°C e pH neutro (7,0-7,2). Esse microrganismo exhibe formas pleomórficas, que variam desde cocóides a bastões filamentosos e medem 0,5 µm a 0,6 µm por 1 µm a 3 µm de tamanho,

não possui cápsula, não esporula, é imóvel e possui fímbrias. O peptidoglicano apresenta como principal constituinte o ácido meso-diaminopimélico, que está relacionado à resistência da parede contra a maioria das peptidases, e a arabinose e galactose são os principais açúcares da parede (DORELLA et al., 2006a).

O crescimento de *C. pseudotuberculosis* na superfície do ágar é inicialmente espaçado e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico, de coloração creme alaranjado e apresenta configurações de letras chinesas típicas; já em meio líquido, a multiplicação celular induz a formação de grumos bacterianos (DORELLA et al., 2006a), o que leva a necessidade de agentes químicos que diminuam este acúmulo de grânulos.

As linhagens de *C. pseudotuberculosis* possuem variações bioquímicas, principalmente quanto a suas habilidades de fermentação. A produção de ácido ocorre a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose, mas não produzem gás (BUXTON et al., 1977; MERCHANT e PACKER, 1967).

### **1.1.3. Epidemiologia**

*C. pseudotuberculosis* é mundialmente distribuída, com uma maior ocorrência na Oceania, África, América do norte e América do Sul (ARSENAULT et al., 2003), e afeta diferentes animais como equinos, ovinos, caprinos, bovinos, entre outros ruminantes.

O número de infecções reportadas por este patógeno, está aumentando e isto se deve, provavelmente, a fatores ambientais e a uma maior susceptibilidade dos rebanhos (FOLEY et al., 2004). Estudos demonstraram que este microrganismo é bastante resistente e pode sobreviver no solo durante muito tempo, em latência, o que facilitaria sua sobrevivência em períodos não favoráveis, e posterior disseminação (AUGUSTINE e RENSHAW, 1982; SPIER et al., 2012).

O modo de transmissão pode variar de acordo com a linhagem bacteriana infectante e do seu hospedeiro. O contágio pode ocorrer através de

feridas superficiais nos animais, causadas por procedimentos veterinários como a castração ou por traumas; pelo contato de animais contaminados; ou via transmissão passiva por vetores como moscas (DORELLA et al., 2006a; SELIM, 2001; RADOSTETS et al., 2000). A infecção inicial pode levar ao desenvolvimento de doenças, pela invasão dos vasos linfáticos dos hospedeiros, podendo ocorrer desenvolvimento de abscessos ou até lesões de pele.

Doenças humanas causadas por *C. pseudotuberculosis* já foram descritas na literatura, e de acordo com Dorella e colaboradores (2013) mais de 33 casos já foram confirmados. Os sintomas observados são semelhantes ao da LC, e o modo de transmissão mais aceito é por contato com animais doentes ou ingestão de carne ou leite contaminados (TROST et al., 2010). Alguns casos reportados desviam dessa provável causa, como por exemplo, o descrito por Wagner e colaboradores (2011), no qual o paciente não teve contato com animais ou fontes contaminadas.

#### **1.1.4. Doenças causadas por *C. pseudotuberculosis***

*C. pseudotuberculosis* é o agente causador de diversas doenças de cunho veterinário. Entre as mais estudadas estão a LC, a LU, a PF e a OSD (KURIA et al., 2001). Uma ênfase maior será dada as duas primeiras.

##### **1.1.4.1. Linfadenite caseosa**

Esta doença é causada pela bactéria Gram positiva *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, e acomete principalmente caprinos e ovinos em diversas regiões do globo, sobretudo na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil (DORELLA et al., 2006a; DORELLA, 2009). A LC ocasiona perdas econômicas devido à baixa na produção de alimentos como a carne e leite, a diminuição do peso dos animais contaminados, gastos com o tratamento, podendo até ocasionar a morte dos mesmos e o comprometimento da carcaça (SEYFFERT et al., 2010).

A LC é uma doença infecto contagiosa crônica, caracterizada pela hipertrofia dos gânglios linfáticos localizados ao longo do corpo do animal,



sobretudo em pequenos ruminantes. A transmissão do microrganismo entre os hospedeiros ocorre principalmente pelo contato com animais infectados, sendo facilitada pela presença de feridas na pele (DORELLA et al., 2006a). Outras formas de contágio seriam o contato direto com secreções infectadas, por equipamentos contaminados, como os de tosquia, ou mesmo água, alimentos, poeiras e banho infectados (RADOSTETS et al., 2000).

Os achados clínicos mais frequentes são abscessos nos linfonodos superficiais e em tecidos subcutâneos, caracterizado pela LC externa que é a forma mais frequente da doença. Os linfonodos normalmente acometidos são os submaxilares, pré-escapulares e supra mamários. A LC visceral, outra forma da doença, é caracterizada pela presença de abscessos internos, principalmente nos pulmões, rins, fígado e baço (PIONTKOWSKI e SHIVERS, 1998). Outras patologias encontradas seriam a pneumonia crônica, ataxia e paraplegia, sintomas presentes quando há envolvimento sistêmico (RADOSTETS et al., 2000).

A doença ainda não apresenta diagnóstico, tratamento ou vacina eficientes. O diagnóstico comumente utilizado são testes sorológicos e identificações bioquímicas e moleculares. Os dois últimos são baseados na cultura bacteriológica do material purulento de animais infectados, enquanto o primeiro utiliza o soro do sangue desses animais. Porém, estes procedimentos não apresentam especificidade e sensibilidade ótimas, além de demandar tempo (RADOSTETS et al., 2000).

As medidas preventivas são utilizadas como forma de controle, e as mais aplicadas são o isolamento dos doentes, a higienização dos materiais cortantes e dos locais que os animais habitam e convivem, e a aplicação de vacinas (WILLIAMSON, 2001). No Brasil, existem algumas vacinas disponíveis para uso, como a vacina viva atenuada produzida a partir da cepa 1002 da *C. pseudotuberculosis*, desenvolvida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A (EBDA) utilizada em caprinos; e a vacina Biodectin® (Fort Dodge), utilizada em ovinos, que contém toxóides purificados de *Clostridium septicum*, agente etiológico do edema maligno, *Cl. novyi* Tipo B (hepatite necrótica), *Cl. tetani* (tétano), *Cl. perfringens* tipo D (enterotoxemia) e culturas inativadas de *Cl. chauvoei* (carbúnculo sintomático), uma fração do *C. pseudotuberculosis* (LC) e um anti-helmíntico (moxidectina) (PINTO, 2011).

#### 1.1.4.2. Linfangite ulcerativa

Linfangite ulcerativa (LU) é uma doença mundialmente distribuída, e afeta, sobretudo equinos, mas que pode atingir bovinos (RADOSTETS et al., 2000). Ela é considerada moderadamente contagiosa e o índice de mortalidade é baixo.

Mais de um agente infeccioso já foi registrado, sendo que *C. pseudotuberculosis* é o mais comum, dito como causador da doença clássica (SINGATHIA et al., 2011). Outros microrganismos reportados como causadores da doença são: *C. pyogenes*, *C. equi*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium necrophorum* e *Streptococcus* spp. (ZAVOSHTI et al., 2009).

A doença é caracterizada pela infecção dos vasos linfáticos dos membros inferiores, a partir de uma ferida na pele, e pelo desenvolvimento de abscessos ao longo do corpo (RADOSTETS et al., 2000). Abscessos no peito e pescoço de equinos também já foram relatados, assim como letargia, anorexia, úlceras em diversas partes do corpo e perda de peso (SINGATHIA et al., 2011).

Doherr e colaboradores (1998) realizaram estudos epidemiológicos sobre doenças em equinos causadas por *C. pseudotuberculosis*, e concluíram que a infecção não está relacionada com sexo ou acasalamento. Mas observaram que o ambiente, no qual os animais vivem, a estação do ano e a idade exercem influência na contaminação pela bactéria. Segundo os autores, logo após o nascimento os animais estão protegidos pela imunidade passiva recebida pela mãe, e quando atingem um ano de vida, sua suscetibilidade a doença aumenta, o que permanece alta até os cinco anos de idade. Após este período, o risco diminui novamente. Outra possível explicação para a relação entre idade e suscetibilidade à doença pode estar vinculado a outros elementos, como a permanência dos animais em ambientes com um baixo ou elevado fator de risco, ou seja, locais com higiene precária, com a presença de animais contaminados, ou mesmo, na presença de possíveis vetores (DOHERR et al., 1998).

Diferentes autores sugerem que vetores estejam envolvidos com a transmissão de doenças como a LU e PF, entre outras doenças causadas por

*C. pseudotuberculosis* (HALL et al., 2001; SELIM, 2001; SPIER et al., 2004). Segundo uma avaliação preliminar realizada por Spier e colaboradores (2004) os padrões sazonais de maior incidência de sintomas, como abscessos, das enfermidades supracitadas coincidem com a presença de PLD na mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*), na mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e na mosca doméstica (*Musca domestica*), o que indica estes insetos como possíveis vetores. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que a bactéria é adquirida pelas moscas através do contato direto dessas com a secreção purulenta de abscessos dos equinos.

As moscas são possíveis vetores, mas não são consideradas reservatórios da bactéria (SPIER et al., 2004). Linhagens de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* são capazes de sobreviverem e multiplicarem em diferentes tipos de solo (arenoso e rochoso), sob diferentes condições ambientais, o que insinua o papel do solo como reservatório (SPIER et al., 2012).

Muitas pesquisas já foram realizadas com o intuito de melhor compreender a doença, além do hospedeiro e o patógeno vinculados a ela, mas muito ainda precisa ser estudado para entender estas e outras relações. Muitos desses estudos envolvem genes específicos, conhecidos como fatores de virulência.

#### **1.1.5. Determinantes de virulência**

Fatores de virulência estão relacionados com a gravidade das doenças, sendo envolvidos nos processos de adesão, invasão e dispersão do patógeno no hospedeiro. Os genes, que exercem estas funções, são induzidos durante a infecção, e o mecanismo que os ativam ou reprimem estão muitas vezes atrelados ao ambiente no qual o patógeno está exposto (SCHUMANN, 2007).

Patógenos intracelulares são expostos a condições extremas durante infecções, e para sobreviverem necessitam de mecanismos que impeçam o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, e ao mesmo tempo permitam sua proliferação e permanência no ambiente hostil. Caso o resultado desta interação seja a sobrevivência do patógeno, essa evasão por parte do microrganismo acaba por provocar a doença no organismo infectado (JIN et al.,

2010; RAYBOURNE e BUNNING, 1994). De acordo com estes autores, apenas uma pequena fração sobrevive nas fases iniciais da infecção, e essa corresponde àquelas bactérias que demonstraram adaptações que permitiram a sobrevivência, por exemplo, dentro dos macrófagos. Estes fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, sendo responsável por proteger o organismo contra agentes infecciosos, e os fatores de virulência possivelmente contribuem para a manutenção do microrganismo, nestes ambientes inóspitos.

Os determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis* são pouco conhecidos, assim como suas ações sobre o controle da expressão gênica (DORELLA et al., 2006a; MCKEAN et al., 2007), e por isso, estudos nesta área são importantes para melhor caracterização e entendimento desses fatores essenciais para a disseminação de doenças.

Estudos anteriores demonstraram que a fosfolipase D (PLD), lipídeos da parede celular e o operon *fagABC* e o gene *fagD* são importantes determinantes de virulência em *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002; CARNE et al., 1956; WILSON et al., 1995).

Normalmente, os genes envolvidos com a virulência dos microrganismos se encontram em regiões do genoma conhecidas como ilhas de patogenicidade. Em *C. pseudotuberculosis*, o gene *pld* e o operon *fagABCD* foram identificados nestas regiões, e, além deles, outros genes se destacam como os genes envolvidos no influxo de magnésio (*mgtE*), íon importante na adaptação a altas temperaturas; fatores sigma extra extracitoplasmáticos, necessários na ativação e repressão de genes, em resposta a condições adversas; proteases, como a serina, importantes na adaptação do microrganismo e reestruturação do seu proteoma (RUIZ et al., 2011; PINTO, 2011).

#### **1.1.5.1. Fosfolipase D**

A exotoxina hemolítica conhecida como fosfolipase D (PLD) é um dos determinantes de virulência mais estudado de *C. pseudotuberculosis*. O gene da PLD codifica uma proteína de 31,4 KDa, que está presente no genoma de *C. pseudotuberculosis* em cópia única, em todos os representantes estudados deste microrganismo, sendo independente do biotipo (SONGER et al., 1988), e

sua ação é bastante semelhante à toxina produzida pela aranha marrom *Loxosceles reclusa* (BERNHEIMER e CAMPBELL; FORRESTER, 1985). A toxina pode ser inativada devido a temperaturas elevadas, meio ácido (pH abaixo de 5,0), durante a estocagem ou por ação da formalina (SELIM, 2001).

A PLD apresenta um papel chave nas doenças provocadas por essa bactéria, sendo capaz de catalisar a dissociação da esfingomielina, constituinte da membrana celular de mamíferos, facilitando assim a dispersão e sobrevivência do patógeno no animal infectado. A dispersão ocorre principalmente do local da infecção para os linfonodos, onde pode acarretar a formação de abscessos (ALVES e OLANDER, 1999; WILLIAMSON, 2001).

Essa proteína age na permeabilidade dos vasos linfáticos e sanguíneo, atuando como (i) hemolisinas com ação necrosante (HIRSH et al., 2003), causando lise de eritrócitos (ii) exotoxina com ação dermonecrótica, por danificar células endoteliais e promover o extravasamento do plasma e acesso aos vasos linfáticos (SONGER et al., 1988), e (iii) leucotoxina, por causar a destruição de macrófagos (TASHJIAN e CAMPBELL, 1983).

#### **1.1.5.2. Lipídios da parede celular**

Os lipídeos da parede são um dos responsáveis por causar a necrose nos tecidos celulares adjacentes às células bacterianas, o que induz algumas das características marcantes das doenças, como o inchaço na região (Dorella et al., 2006a). Esta propriedade foi observada em estudos com porquinhos-da-índia (JOLLY, 1966), caprinos (JJ e SG, 1983), camundongo (CA e CL, 1983).

Esta capacidade de necrose ocorre devido à resistência do patógeno ao sistema imune do hospedeiro (BRAITHWAITE et al., 1993). Segundo estes autores, os lipídeos da parede conferem a bactéria a capacidade de resistência a digestão por enzimas celulares, o que dificulta sua fagocitose. Outra habilidade conferida por estes lipídeos é a de baixa permeabilidade do envelope celular, oferecendo uma barreira natural contra antibióticos (PORTEVIN et al., 2004).

Como mencionado anteriormente, um dos componentes da parede celular de *C. pseudotuberculosis* são os ácidos micólicos. Estes são ácidos graxos de cadeia longa, que auxiliam na estrutura e função da parede, além de

ser utilizado como caracter morfológico para classificação das espécies (COLLINS et al., 1982a, 1982b; LIU et al., 1996; PORTEVIN et al., 2004).

### 1.1.5.3. Sistema transporte ABCD de ferro

O operon *fagABC* e o gene *fagD* são codificadores de proteínas importantes no transporte e aquisição de ferro (BILLINGTON et al., 2002; DORELLA et al., 2006b). Este operon está localizado *downstream* do gene *pld* (BILLINGTON et al., 2002; DORELLA, 2009). Outro operon importante em *C. pseudotuberculosis* envolvido no transporte e aquisição do ferro é o operon *ciuABCD* (CARSON et al., 1999; RUIZ et al., 2011).

O ferro é considerado um elemento essencial para a sobrevivência dos organismos vivos. Isto ocorre, pois esse nutriente é necessário em diversas funções celulares. Uma variedade de enzimas (catalases, citocromos, nitrogenases) o requererem para sua funcionalidade (LITWIN e CALDERWOOD, 1993). Segundo os autores, devido a insolubilidade deste composto, os microrganismos utilizam diferentes mecanismos para a aquisição do ferro, e estes estão diretamente ligados com a virulência dos patógenos.

No hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* necessita de fontes alternativas de ferro, já que no ambiente o nutriente é escasso, e os genes citados no início do tópico suprem essa necessidade. Billington e colaboradores (2002) analisaram a região na qual o operon *fag* está inserido em *C. pseudotuberculosis*, incluindo os genes e as regiões intergênicas envolvidas, e para isso utilizaram o sistema *lacZ* e mutantes para avaliar a expressão e caracterizar os componentes envolvidos. Os autores também verificaram a importância desse sistema *in vivo*, uma vez que o mutante do gene *fagB* apresentou uma redução na capacidade de infecção e sobrevivência no hospedeiro.

O gene *fagA* e *fagB* codificam as proteínas FagA e FagB, respectivamente. Estudos indicaram que as proteínas são hidrofóbicas e apresentam porcentagens altas de similaridade e identidade com as proteínas FepD e FepG, respectivamente. Estas são expressas por *Escherichia coli* e fazem parte do sistema enteroquelina, sideróforo de alta afinidade ao ferro (BILLINGTON et al., 2002).

O gene *fagC* codifica a proteína FagC, similar a proteína citoplasmática FepC de *E. coli*. FagC apresenta um domínio transportador ABC, que incluem sequências associadas a ligação de ATP (BILLINGTON et al., 2002).

O quarto gene *fagD* codifica FagD, que é similar a proteína de ligação ao sideróforo-ferro, apresentado domínios conservados da família e sequência de aminoácidos do complexo ligação ao ferro. FagD também possui similaridade com a suposta proteína FecB de *Synechocystis* spp., e com a lipoproteína SirA de *Staphylococcus aureus*, envolvidas com ligação e regulação do ferro, respectivamente (BILLINGTON et al., 2002).

Outro fator avaliado pelos autores foi a região intergênica entre os genes *fagA* e *fagD*. Nela está presente uma sequência consenso similar ao sítio de ligação de DtxR, proteína reguladora da resposta ao ferro.

Outro trabalho importante envolvendo os genes de aquisição de ferro foi realizado por Dorella e colaboradores (2006b) envolvendo vacinas recombinantes obtidas pela técnica de mutagenese aleatória utilizando o transposon TnFuZ. Um dos mutantes obtidos, denominado CP13, apresenta uma proteína secretada mutada. Esta está relacionada ao do sistema de transporte de ferro, ligada ao operon *ciu* e uma avaliação preliminar sugere que a linhagem é incapaz de sobreviver dentro da célula hospedeira e demonstrou ser uma candidata vacinal promissora (DORELLA, 2009). Testes in vivo foram realizados para avaliarem esta hipótese, e a cepa mutante apresentou sobrevivência reduzida, em camundongos, mas foi capaz de induzir uma resposta humoral nos animais (RIBEIRO et al., 2014). Segundo os autores, a mutação acarretou a uma atenuação de CP13, e após o desafio, com uma linhagem virulenta, os camundongos imunizados com CP13 apresentaram uma taxa de sobrevivência de 80%. Estes resultados sugerem CP13 como um potencial candidato imunogênico.

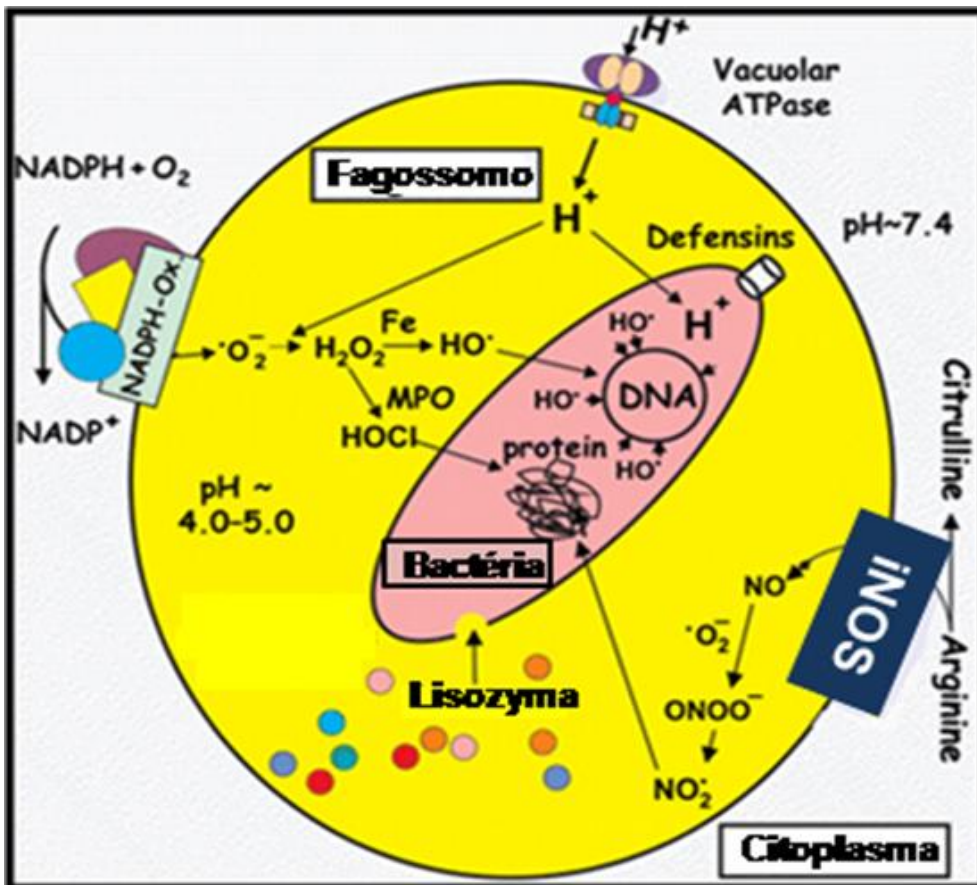
Como já comentado, durante a infecção o patógeno é exposto a diferentes condições de estresse, e os fatores de virulência são necessários para a sobrevivência do patógeno. Algumas dessas condições serão tratadas a seguir.

## 1.2. Condições de estresse

As bactérias são organismos que comumente enfrentam condições de estresse, ou seja, se deparam com situações ambientais que não estão habituadas. Para sobreviver a estas alterações, como mudanças na temperatura, pH e osmolaridade, diferentes estratégias são aplicadas, como a síntese de proteínas induzidas por estresse (JAKOB et al., 2007).

Organismos patogênicos, como *C. pseudotuberculosis*, enfrentam condições de estresse dentro de seus hospedeiros, antes e durante a fagocitose. Inicialmente, as bactérias são expostas a ions cálcio extracelular, e a figura 1 exemplifica as modificações que ocorrem durante um processo de fagocitose, e consequente constituição do fagossomo/fagolisossomo. Este é formado após um fagócito, como um macrófago, se fundir a partículas estranhas, como uma bactéria, na tentativa de eliminar a mesma. O fagolisossomo se forma pela fusão do fagossomos com lisossomos, organelas celulares que catalisam digestões pela atividade de enzimas hidrolíticas. Nesta figura é possível observar algumas alterações importantes como a diminuição do pH, crucial para a ação ótima das enzimas, a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários reativos de nitrogênio, que visam a eliminação da bactéria, entre outras partículas estranhas (ANTUNES e MEGID, 2013; CRUVINEL et al., 2010).





**Figura 1: Alterações bioquímicas durante fagocitose.** Durante a digestão celular no fagossomo, um pH ácido é necessário para a ação ótima das enzimas hidrolíticas. Este é mantido pela hidrólise de ATP, e posterior bombeamento dos íons H<sup>+</sup> para o lúmen. Esta digestão é possível pela formação do fagolisossomo, junção do lisossomo (representado pela “*lisozyma*”) com o fagossomo. (Adaptado - <http://www.uni-koeln.de/>)

Outras modificações que ocorrem durante a infecção, no hospedeiro, consistem na elevação da temperatura, devido a ação de citocinas e mediadores, aumento da pressão osmótica, pela presença de solutos no meio externo e consequente saída de água, por osmose, do meio interno para o meio externo.

Neste contexto, os estresses ácido, térmico e osmótico foram selecionados com o intuito de verificar a influência destas condições de estresse, na resposta bacteriana ao fagolisosso.

### 1.2.1. Estresse ácido

Como mencionado anteriormente, o ambiente ácido, dentro do fagossomo, é importante para a atividade ótima de enzimas hidrolíticas, como proteases e lipases, assim como a estabilidade das mesmas. Além da presença das enzimas digestivas, este ambiente também ameaça a sobrevivência dos patógenos, ao dificultar o metabolismo e causar danos nas macromoléculas dos mesmos (SATORHELYI, 2005). Segundo Follmann e colaboradores (2009), o pH apresenta impacto na solubilidade de nutrientes e oligoelementos, como o ferro, e por todos os motivos supracitados a maioria das bactérias mantém o pH interno neutro ou alcalino.

Estudos envolvendo resposta aos ambientes ácidos revelaram a participação de diversos processos celulares com o intuito de amenizar os danos causados e adaptar as bactérias à situação, à custa de um crescimento limitado (FOLLMANN et al., 2009).

Satorhelyi (2005), estudando bactérias Gram positivas, avaliou a resposta dessas à mudança de pH, e demonstrou que elas utilizavam estratégias de sobrevivência conhecidas como sistema de Tolerância ao Estresse Ácido (TEA). Este processo adaptativo é responsável pela manutenção da homeostase, e já foi descrito nas bactérias *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis* e *Corynebacterium glutamicum* (JAKOB et al., 2007).

*C. glutamicum* é uma bactéria modelo, devido a sua importância biotecnológica. Por ser considerada segura, ao manuseio, este microrganismo é utilizado como base para estudos mutagênicos, e os resultados obtidos são extrapolados para as bactérias patogênicas pertencentes ao seu gênero, como *C. diphtheriae*, *C. jeikeium* e *C. pseudotuberculosis* (SELETZKY et al., 2006). Diversos autores reportaram a importância da adaptação de *C. glutamicum* no ambiente ácido (FOLLMANN et al., 2009; JAKOB et al., 2007; SELETZKY et al., 2006). Esses observaram que quando o microrganismo era exposto a um pH ácido maior que cinco, e depois exposto a um pH mais baixo, sua sobrevivência e crescimento era maior que quando exposto a um pH menor que cinco, sem aclimatização. Os autores também ressaltaram que após atingir a aclimatização, um número menor de genes é necessário na sobrevivência da

bactéria na condição ácida, mas mantendo um crescimento baixo. Isto pode ser explicado devido ao alto gasto energético necessário na manutenção do pH interno ideal (JAKOB et al., 2007).

### 1.2.2. Estresse térmico

A resposta celular contra o estresse térmico é uma das mais estudadas, e é considerada modelo de análise da expressão gênica (STEWART et al., 2002). Essa resposta consiste em uma mudança transcricional global, que fundamentalmente foca na expressão elevada de um conjunto de proteínas conhecidas como *heat-shock proteins* (HSP). Estas proteínas são conservadas entre os organismos, e muitas delas são chaperonas responsáveis pela proteção do DNA contra danos e no dobramento de outras proteínas; ou proteases dependentes de ATP (BARREIRO et al., 2009; EHIRA et al., 2009; MUFFLER et al., 2002; STEWART et al., 2002). É importante ressaltar que HSPs também são ativadas por mudanças no pH e por estresse oxidativo, durante o crescimento bacteriano (TRAN et al., 2006).

Em condições adversas, as HSPs induzem a transcrição de genes relacionados, que podem ser subdivididos em três categorias: (i) envolvidos no remodelamento da membrana celular, para a manutenção das principais funções celulares; (ii) prevenção e eliminação das modificações na estrutura do RNA e DNA (iii) genes envolvidos com geração de energia, assegurando as respostas dependentes de ATP. (HAN et al., 2005).

A indução das HSPs pode ocorrer tanto no patógeno como no hospedeiro, durante a infecção, e um dos mecanismos de estímulo desta indução é o acúmulo de peptídeos “mal dobrados” (ASEA et al., 2000; NARBERHAUS, 1999). A presença dessas proteínas, no processo infeccioso, contribui para o reconhecimento do microrganismo, o que auxilia na manutenção celular e na resposta imune (ASEA et al., 2000).

Diversos autores estudaram a reação de *C. glutamicum* em condição de estresse térmico. Muffler e colaboradores (2002) estudaram a expressão gênica global, utilizando a técnica de *shotgun*. Enquanto outros pesquisadores estudaram abordagens proteômicas (BARREIRO et al., 2005), ou focaram proteínas específicas, como HspR e HrcA (BARREIRO et al., 2009), ou

avaliaram a expressão diferencial, utilizando *microarray* e técnicas de mutagênese (EHIRA et al., 2009).

Em *C. pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, (MCKEAN et al., 2007) avaliaram a expressão diferencial utilizando *microarray* e confirmação por qRT-PCR. Nesse estudo, os autores verificaram que os fatores de virulência PLD e FagC estão reprimidos na situação de estresse, mas outros estudos são necessários para uma melhor compreensão desses mecanismos. Outro fator reprimido importante é o gene *fas*, que codifica a enzima que sintetiza ácidos graxos da parede celular (*fatty acid synthase*). Neste caso, na literatura existem estudos que enfatizam a necessidade de uma modulação (fluidez) na membrana, em resposta a mudanças na temperatura (KREMER et al., 2000). Outra hipótese seria priorizar a manutenção e sobrevivência celular ao invés do crescimento, e segundo (MAGNUSON et al., 1993) uma diminuição na biossíntese de ácidos graxos implica em uma baixa taxa de crescimento celular.

### **1.2.3. Estresse osmótico**

Em uma situação de estresse osmótico, o microrganismo libera espontaneamente água para o meio, com o objetivo de balancear a osmolaridade entre o meio externo e o celular (SKJERDAL et al., 1995). Normalmente este fluxo para o ambiente externo não é suficiente, e por isso as bactérias acumulam osmorreguladores (FRÄNZEL et al., 2010; RÖNSCH et al., 2003; SKJERDAL et al., 1996). Osmorreguladores são solutos compatíveis, ou seja, solutos que atuam na proteção de macromoléculas ou células em condições de estresse, como o térmico (altas e baixas temperaturas), o osmótico, e contra a dessecação (COSTA et al., 1998). Segundo os autores, solutos compatíveis apresentam baixo peso molecular, estão presentes em uma variedade de microrganismo, são sensíveis a altas concentrações de sais (inorgânicos e orgânicos), e são capazes de proteger funções celulares. Neste último caso, esta proteção ocorre sem que haja a necessidade de grandes modificações celulares, ou seja, ocorre de forma rápida e versátil. Dessa forma, eles são considerados mais eficientes, na osmoregulação, que íons como sódio, cálcio e potássio. Exemplos desses solutos são: açúcares (sacarose e trealose); aminoácidos (prolina, alanina, glutamina); entre outros.

O estresse osmótico é bastante estudado em *C. glutamicum*, devido tanto à importância biotecnológica desta bactéria, como por ela constantemente enfrentar situação de estresse osmótico tanto no solo, seu habitat natural, quanto no processo fermentativo (FRÄNZEL et al., 2010; RÖNSCH et al., 2003; SKJERDAL et al., 1996). Esses autores enfatizaram a importância dos osmorreguladores na sobrevivência de *C. glutamicum*, em ambiente hiper osmótico, ao ressaltar ação dos solutos no restabelecimento do crescimento, na proteção de proteínas globulares e na prevenção da plasmólise, além de observarem que os osmólitos poderiam ser tanto sintetizados pela bactéria, como retirados do meio.

Fränzel e colaboradores (2010) realizaram estudos do transcriptoma de *C. glutamicum* em estresse osmótico e observaram uma alteração na composição do envelope celular, apesar da produção dos ácidos micólicos não ser afetada. Outra conclusão obtida pelos autores foi a ausência de evidências que indicam que o estresse oxidativo ocorra em decorrência ao osmótico, como observado em *Bacillus subtilis* (KALINOWSKI et al., 2003), e por esta indução ocorrer no estresse ácido, em *C. glutamicum* (FOLLMANN et al., 2009).

Em decorrência ao estresse osmótico, a quantidade energética necessária para a manutenção celular aumenta. Isto ocorre devido a uma junção de fatores, com a manutenção do gradiente iônico da membrana, a difusão de íons para o citoplasma, a transcrição e tradução de genes indispensáveis na sobrevivência nestas condições extremas (VARELA et al., 2004; VARELA et al., 2003). Os autores também enfatizam que nestas condições a célula prioriza a homeostase, em detrimento ao crescimento, como mencionado para os outros estresses, e por isso, a produção de biomassa cai, mas o consumo de substrato e produção de CO<sub>2</sub> aumentam, com o objetivo de manter a integridade celular.

A adaptação celular a diferentes condições ambientais é um processo importante para a sobrevivência do patógeno, e conhecer a biologia do microrganismo é importante para entender como os mesmos conseguem adaptar a estes ambientes. Os estudos genômicos contribuem na identificação de genes relacionados ao estilo de vida e patogenicidade das bactérias, e este conhecimento facilita a busca por candidatos a fatores de virulência e alvos vacinais (RUIZ et al., 2011).

### 1.3. Genética e *Corynebacterium pseudotuberculosis*

#### 1.3.1. Projeto Genoma

Inicialmente, estudos envolvendo o genoma eram centrados em genes individuais ou nos genomas pequenos e repetitivos. Em ambos os casos, os alvos apresentavam alguma importância econômica e médica, como por exemplo, a associação com doenças. Isto era devido, principalmente, a capacidade de resolução das técnicas disponíveis na época. E hoje em dia, as técnicas utilizadas permitem estudos no genoma por completo (KOBOLDT et al., 2013). Este foi o caso do genoma de *C. pseudotuberculosis*.

O projeto genoma dessa bactéria teve início em 2006, pela Rede Genoma de Minas Gerais (RGMG), apoiada pela FAPEMIG, e em 2009 o genoma da linhagem 1002, agente etiológico da LC, foi finalizado. Atualmente este projeto é apoiado pela Rede Paraense de Genômica e Proteômica (RPGP), financiada pela FAPESPA, e 15 linhagens deste patógeno estão depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information databases*), e 28 estão em processo de finalização (comunicação pessoal).

O nosso grupo do laboratório de genética celular e molecular (LGCM) está envolvido em diferentes linhas de pesquisa com *C. pseudotuberculosis*, abordando diferentes enfoques genômicos, transcriptômicos e proteômicos, que visam primeiramente o conhecimento biológico deste patógeno de grande importância veterinária, conhecimento este que também pode ser extrapolado e relacionado com outras espécies do gênero, de importância médica, veterinária e biotecnológica. Outra abordagem é a produção de vacinas que sejam eficientes e capazes de proteger os diferentes hospedeiros desta bactéria, além de kits diagnósticos capazes de identificar a presença do patógeno de forma eficiente e rápida.

Com o advento da tecnologia de nova geração, o sequenciamento (NGS – *Next Generation Sequencing*) de diferentes linhagens bacterianas tornou-se possível. E a aplicação desta nova tecnologia é uma das grandes responsáveis pelos trabalhos desenvolvidos pelo LGCM no presente.

### 1.3.2. Tecnologia de Nova Geração

O emprego da tecnologia de nova geração gerou um aumento do número de genomas sequenciados, de acordo com os dados do NCBI. Este fato é devido principalmente à rapidez e baixo custo das novas plataformas comparadas com a de primeira geração, sequenciamento pelo método Sanger (PRACHI et al., 2013). Esta mudança no cenário tecnológico provocou outros progressos científicos, como estudos do transcriptoma, epidemiológicos, filogenéticos, metagenômica, desenvolvimento de vacinas.

Dentre as novas tecnologias, a plataforma SOLiD™ (*Applied Biosystems*) foi selecionada para o presente estudo. Esta plataforma foi utilizada pela primeira vez na América Latina em 2009, no sequenciamento do transcriptoma de *Bacillus anthracis* (PASSALACQUA et al., 2009), além de ser a plataforma utilizada no sequenciamento do genoma da linhagem Cp258, foco deste trabalho (PINTO, 2011). Esta linhagem foi extraída de um cavalo infectado com LU, na Bélgica, e de acordo com Soares e colaboradores (2013), este representante do *biovar equi* possui um conteúdo G+C de 52,15%, 12 rRNAs, 49 tRNAs, 2195 genes e 46 pseudogenes.

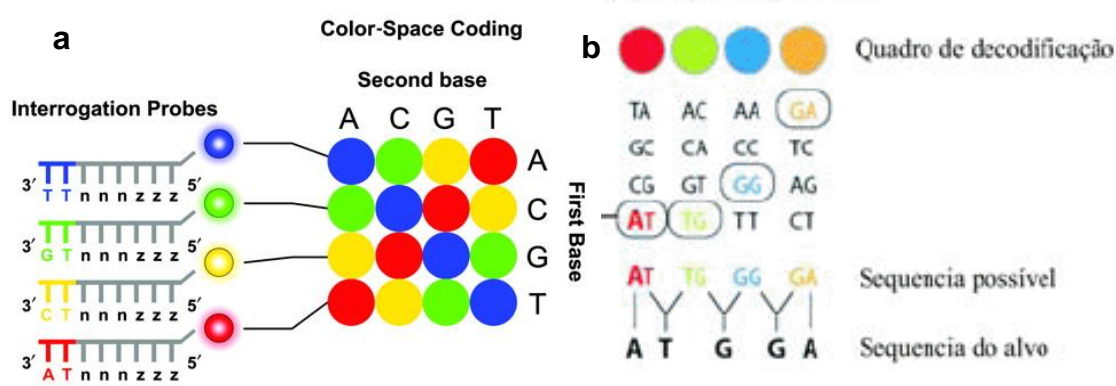
#### 1.3.2.1. Plataforma SOLiD™

A plataforma SOLiD™ (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) foi desenvolvida pela *Applied Biosystems* e lançada em 2007. Trata-se de uma NGS de segunda geração, que utiliza duas metodologias para a construção da biblioteca (fragmentos ou *mate-paired*); PCR em emulsão (emPCR) para amplificação; sequenciamento por ligação; e leitura da imagem por fluorescência (METZKER, 2010). Neste trabalho focaremos na biblioteca por fragmentos.

Os fragmentos são ligados a adaptadores universais e amplificados por emPCR sobre a superfície de uma esfera (*bead*), sendo um fragmento por esfera. Após a amplificação, o material é depositado em lâminas de vidro e seguem para o sequenciador. A reação de sequenciamento é catalisada pela ação da enzima DNA ligase, através da incorporação de sondas marcadas com fluorescências. Dessa forma, duas bases são interrogadas simultaneamente

(dinucleotídeos) na sequência alvo em uma única etapa, seguida da leitura do sinal e remoção do fluoróforo antes da incorporação do próximo dinucleotídeo (METZKER, 2010).

O resultado da leitura dos sinais fluorescentes gera um código de cores que é analisado na forma de uma matriz de cores para então ser transformado no tradicional código de letras (MARDIS, 2008). Ele usa quatro cores fluorescentes para codificar 16 combinações possíveis entre duas bases (figura 2). Este método de sequenciamento permite interrogar cada base duas vezes, em ciclos independentes de iniciadores, o que torna possível diferenciar verdadeiros polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de erros de sequenciamento, além de identificar outras variações genômicas como inserções, deleções e rearranjos estruturais (MAGI et al., 2010; METZKER, 2010).



**Figura 2: Matrix de cores da plataforma SOLiD.** Cada cor da matrix simboliza duas bases, de forma que a partir da próxima fluorescência é possível identificar a segunda base. 2a – Matrix com as 16 combinações possíveis, dispostas em 4 cores e uma combinação de base de duas a duas. Cada sonda interrogativa é seguida por bases degeneradas e emitem uma cor específica. 2b – A partir da sequência de cores é possível identificar a sequência de bases, de forma que cada base da sequência nucleotídica é investigada duas vezes. (2a Adaptado de VOELKERDING et al., 2009; 2b Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).

Atualmente a plataforma está na versão 4, porém a versão utilizada no presente estudo foi a 3 Plus do SOLiD™. O sequenciamento desta versão possui um tempo de corrida de 6 dias, sendo capaz de gerar leituras de



aproximadamente 50 bases, com um rendimento de 60 Gb (um bilhão de *reads* por corrida) (<http://www.appliedbiosystems.com>).

A plataforma é utilizada no sequenciamento de genomas e de transcriptomas. Este sistema permite caracterizar todo o transcriptoma de um organismo, descobrir novos transcritos, identificar mutação, deleção, inserção e *splicing* alternativo ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Diante das vantagens da plataforma SOLiD™, a mesma foi escolhida para sequenciar o transcriptoma de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, e assim verificar os transcritos presentes nas condições de estresse ácido, térmico e osmótico.

### 1.3.3. Transcriptoma

Transcriptoma é o conjunto de todos os transcritos da célula, codificantes e não-codificantes, de um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica. Entender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares da célula, e assim, compreender o desenvolvimento e as doenças (WANG et al., 2009).

O RNA bacteriano corresponde a cerca de 20% do peso seco nos procariotos (EVGUENIEVA-HACKENBERG e KLUG, 2011). O estudo do transcriptoma bacteriano apresenta muitos desafios, ao comparar com o eucarioto. Isto ocorre devido ao fato do RNA desses microrganismos não apresentar a cauda poliA, e por isso, o mesmo não pode ser isolado por técnicas moleculares de hibridização, bastante utilizada nos eucariotos (VAN VLIET, 2010). Outros motivos, segundo o autor, seria a elevada concentração de rRNAs e tRNAs, e a meia vida curta da molécula (mRNA *decay* e degradação) (DEUTSCHER, 2006). No entanto, ao relacionar com o sequenciamento, o RNA bacteriano é mais simples de analisar, devido à ausência de íntrons, *splicing* alternativo e quantidades menores de dados.

RNA-seq, sequenciamento de transcritos utilizando a tecnologia de nova geração, nos possibilita identificar os transcritos totais produzidos pelo organismo, em um momento específico, inclusive os raros, que possuem papéis regulatórios importantes (MARTIN e WANG, 2011). A técnica foi

descrita pela primeira vez em eucariotos (WILHELM et al., 2008), apresentando melhorias na resolução de bases únicas, redução do ruído de fundo, e melhoria da sensibilidade, ao comparar com as técnicas de *array* (GÜELL et al., 2011; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Experimentos envolvendo RNA-seq são capazes de elucidar questões envolvendo o transcriptoma estrutural, o transcriptoma diferencial e estudos de metagenômica de bactérias não cultiváveis. O primeiro foca na arquitetura dos transcritos, ou seja, na composição absoluta dos RNAs e como eles se diferem estruturalmente (PASSALACQUA et al., 2009). Neste estudo, os autores apontaram que os dados provenientes do RNA-seq bacteriano podem definir a estrutura de operons, assim como os limites dos transcritos (5'UTR e o sítio de início da transcrição - TSS), identificar elementos previamente não reconhecidos no genoma, e dessa forma melhorar as anotações existentes.

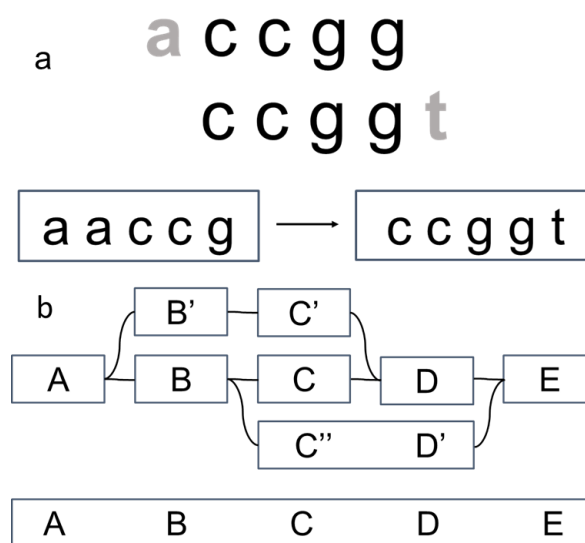
Os transcritos sequenciados por NGS também podem ser utilizados como método de anotação do genoma, como citado anteriormente. A montagem pode ser realizada utilizando referência ou não. No último caso, conhecido como montagem *de novo* ou *ab initio*, o alinhamento é feito por similaridade entre as *reads*, e os softwares que utilizam esta metodologia podem ser divididos em três abordagens principais: *Overlap-layout-consensus* (OLC); algoritmo guloso; e caminho euleriano (MBANDI et al., 2014; ROBERTSON et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

A metodologia utilizada neste trabalho foi o caminho euleriano ou grafo de Bruijn (figura 3), mais precisamente, o software Velvet (ZERBINO e BIRNEY, 2008). Este realiza a montagem processando leituras quebradas (*k-mers*), de comprimento *k* pares de base (*pb*), que representa o tamanho original da leitura (ROBERTSON et al., 2010).

Zerbino e Birney (2008), com o intuito de manipular o caminho euleriano de forma eficiente, desenvolveram um conjunto de algoritmos (Velvet). Este software é capaz de resolver *reads* curtas geradas em grande quantidade (como as do NGS), durante a montagem. Desta forma é capaz de resolver repetições e remover erros de maneira eficaz e mais rápida, comparado aos outros grafos, uma vez que não requer alinhamento para a par. De acordo com Robertson e colaboradores (2010), os erros de pareamento do Velvet são menores, ao comparar com as outras abordagens, pois no grafo de Bruijn as

estruturas dos dados são baseadas nos *k*-mers e não nas *reads*, e por isso as redundâncias são resolvidas, sem afetar o número de vértices.

Outras terminologias importantes representadas na figura 3 são os vértices (*k*-mers) e os arcos (*k*-1). O último simboliza as sobreposições entre os *k*-mers, de forma que os vértices de origem (prefixo) e o de destino (sufixo), de vértices adjacentes, são ligados pela mesma sequência de sobreposição (*k*-1) (POP et al., 2002). E segundo os autores, a reconstrução da sequência consiste no caminho percorrido todos os arcos, por apenas uma vez (figura 3b).



**Figura 3: Grafo de Bruijin** 3a – As *reads* foram quebradas em *k*-mers=5. As letras em cinza simbolizam os prefixos (esquerda) e sufixos (direita) dos vértices, simbolizados pelos retângulos (*k*-mers) e a seta representa os arcos (*k*-1), também identificado pelas letras pretas (ccgg). 3b – Os retângulos simbolizam os vértices e as curvas os arcos. Cada vértice foi utilizado apenas uma vez para traçar o caminho final da sequência. (2a Adaptado de MILLER et al., 2010; 2b Adaptado de ZERBINO e BIRNEY, 2008).

As plataformas NGSs geraram uma grande quantidade de dados, e por isso, a montagem é um grande desafio, mas ferramentas bioinformáticas são constantemente desenvolvidas com a finalidade de solucionar este e outros problemas (ZHANG et al., 2011).

Estudos envolvendo a expressão diferencial são utilizados na identificação de transcritos, em diferentes condições ambientais, com o intuito

de comparar uma situação de estresse com a fisiológica de cultivo. Neste tipo de estudo é possível identificar ativação e repressão de genes, nas diferentes condições de estresse em que foram submetidos. Estas condições simulam o ambiente no qual os microrganismos estão expostos, durante uma infecção no hospedeiro, e os genes que se sobressaem nestes estudos representam os prováveis alvos de pesquisa mais aprofundadas, ou seja, genes candidatos a alvos vacinais ou outros estudos biológicos. O conjunto de genes regulados por uma determinada condição ambiental é denominado *stimulon* (RAMOS et al., 2001; ZHOU e YANG, 2006).

Um estudo semelhante foi realizado por Pinto e colaboradores (2012) envolvendo a linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, e o mesmo foi utilizado como base de comparação para os resultados obtidos para a linhagem 258. Esse e outro estudo envolvendo o transcriptoma de Cp1002 serão tratados a seguir, uma vez que auxiliaram a concepção deste trabalho.

#### **1.3.3.1. Projeto Transcriptoma de *C. pseudotuberculosis***

*C. pseudotuberculosis* linhagem 1002 teve seu transcriptoma funcional analisado (PINTO, 2011; PINTO et al., 2012). Pinto (2011) avaliou o transcriptoma diferencial, comparando a situação controle (BHI), onde a replicação ocorreu em condições fisiológicas, com três situações de estresse abióticos. Estas mimetizavam o ambiente enfrentado pela bactéria, no hospedeiro, durante o período dentro dos macrófagos, e os três estresses selecionados foram o ácido (meio BHI suplementado com ácido clorídrico), o térmico (meio BHI na temperatura de 50°C) e o osmótico (meio BHI suplementado com cloreto de sódio). Neste estudo, a autora apresentou um trabalho pioneiro no Brasil, que identificou regiões transcricionalmente ativas, em *C. pseudotuberculosis* 1002, nas diversas condições testadas. Genes diferencialmente expressos foram observados, devido a influência dos estresses em cada um desses.

O estresse térmico foi a condição que obteve menos genes diferencialmente expressos, enquanto as condições ácida e osmótica obtiveram praticamente a mesma quantidade, o que indica que logo no início

da fase log, o microrganismo ativa estes genes com o intuito de sobreviver no ambiente nocivo. Muitos genes importantes foram identificados, entre eles alguns relacionados a virulência e sobrevivência do patógeno no hospedeiro, como *ahpD*, *fagD* e *dps*. Estes representam potenciais alvos para tratamento e produção de vacinas, e são candidatos a serem explorados em estudos futuros (PINTO, 2011).

Outro estudo envolvendo *C. pseudotuberculosis* 1002 foi desenvolvido por Pinto e colaboradores (2012). Neste trabalho foi descrito o software coreStlmulon (CSI), com o intuito de identificar os transcritos compartilhados entre os *stimulons* da linhagem. Para isso, primeiramente, foram identificadas as CDSs (*coding sequences*), a partir da montagem *ab initio* dos transcritos gerados pelo sequenciamento. Depois elas foram adicionadas ao Blast2go, que associa cada CDS a sua respectiva identidade gênica, de acordo com a anotação funcional, via *Gene Ontology* (GO). E, por fim, o programa CSI reorganiza os resultados gerados no Blast2go, ou seja, agrupa as CDSs que fazem parte do mesmo “processo biológico”. Desta forma, CSI facilita e simplifica a visualização dos resultados obtidos pelo Blast2go, e conseqüentemente dos possíveis alvos vacinais, que são apenas expressos em determinadas condições ambientais (PINTO et al., 2012).

Os autores observaram que os genes do core *stimulon* de *C. pseudotuberculosis* estão envolvidos, em sua maioria, nos processos de “óxido redução”, “divisão celular”, “ciclo celular” e processo “biosintético”, e que os genes são ativados quando o microrganismo está em um ambiente hostil. Os resultados obtidos por Pinto e colaboradores (2012) condizem com os obtidos por (SCHELL, 1993) que sugerem que a bactéria reduz seu crescimento, e não cessa, durante uma condição de estresse, o que indica ser uma estratégia de sobrevivência.

Este é o primeiro trabalho conduzido da análise transcricional, em diferentes condições de estresse, de um representante do biovar *equi*. Este conhecimento será de grande utilidade para a melhor compreensão da biologia deste microrganismo e dos genes transcritos durante as situações de estresse. E futuramente será possível traçar medidas necessárias para evitar o contágio dos hospedeiros, pelo microrganismo, e conseqüentemente a disseminação da doença. Uma vez que, como previamente mencionado, as vacinas atuais não

são eficazes em todos os animais afetados, principalmente quando se trata de diferentes biovars. Todas as vacinas disponíveis no mercado, atualmente, foram produzidas a partir de estudos com o biovar *ovis*.

Neste contexto, estudos moleculares envolvendo o biovar *equi* seriam de extrema importância para tentar suprir a lacuna existente. A pesquisa básica é o primeiro passo para esclarecer muitos dos grandes mistérios e problemas enfrentados na ciência. Um estudo do transcriptoma, por exemplo, é capaz de identificar fatores relacionados à patogenicidade do microrganismo, aprofundar o conhecimento biológico, bem como sugerir, com uma maior probabilidade, possíveis candidatos vacinais, kits para diagnóstico ou terapias eficazes contra doenças, ao identificar genes nos quais a expressão modifica durante uma infecção.

Diante destas informações, é necessário simular *in vitro* as condições que este patógeno enfrenta em um processo infeccioso. Assim, os meios ácido, térmico e osmótico foram selecionados para mimetizar algumas modificações ambientais, que ocorrem dentro do macrófago, durante o processo de fagocitose, tomando como referência os trabalhos de Pinto e colaboradores (2012) e o de Pinto (2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Identificar os transcritos da linhagem 258 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nas condições de cultivo de estresse ácido (pH 5,0), térmico (50°C) e osmótico (2M), que simulam aquelas enfrentadas durante a infecção no hospedeiro.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a curva padrão de crescimento de *C. pseudotuberculosis*;
- Caracterizar as CDSs, obtidas pelo sequenciamento e montagem dos transcritos das diferentes condições de cultivo, em “processos biológicos” utilizando os softwares Blast2go e CSI;
- Comparar os resultados dos stimulons das três condições de estresse analisadas com os resultados da condição fisiológica;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Linhagem selecionada no estudo**

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 258 (CP003540) foi utilizada como organismo modelo deste trabalho. A mesma encontra-se armazenada na bacterioteca do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este microrganismo é um representante do sorotipo II (*equi*) da espécie, e foi isolado de um cavalo infectado com LU, na Bélgica (SOARES et al., 2013).

### **4.2. Curva de crescimento da linhagem 258**

Uma colônia da linhagem 258 selvagem foi isolada a partir de uma placa de Petri contendo o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) Agar sem antibióticos e posteriormente foram preparados pré-inóculos de 20 mL de meio BHI líquido acrescido de Tween® 80 (Sigma-Aldrich) à concentração final de 0,05%. Após 24 horas de crescimento em incubadora tipo shaker a 37°C e 160rpm, parte dos cultivos foram re-inoculados (1:100) em 20mL de meio BHI acrescido de Tween® 80 0,05%, e novamente incubados sob as mesmas condições previamente mencionadas. A cultura foi monitorada através de leituras de densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ). As medições ocorreram a partir do tempo zero (após a diluição do pré-inóculo e antes da incubação no shaker) até atingir o início da fase estacionária, o que ocorreu 14 horas após a inoculação.

### **4.3. Cultivo celular de *C. pseudotuberculosis* em diferentes condições de estresse**

As diferentes condições de estresse (térmico, osmótico, ácido) e a fisiológica de crescimento, bem como a escolha da fase inicial de crescimento exponencial ( $DO_{600nm}=0,2$ ), foram determinadas por trabalhos realizados por Pacheco (2010), Castro (2009) e Pinto (2011). O material obtido para cada



condição foi destinado à extração do RNA total, e posterior análise do perfil transcricional da linhagem 258 de *C. pseudotuberculosis*, nas situações adversas e no controle.

Um pré-inóculo foi diluído para a concentração de 1:100, em meio BHI fresco acrescido de Tween® 80 0,05% e incubado à 37 °C e 160 rpm, até atingir o início da fase exponencial de crescimento ( $DO_{600nm} = 0,2$ ). Logo após atingir a fase desejada, a cultura foi dividida, em quatro diferentes frações de 15mL, e centrifugadas em tubos Falcon 50mL, por 3 minutos a 4000rpm, em temperatura ambiente.

Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em diferentes condições, que serão detalhadas a seguir, em tópicos distintos.

#### **4.3.1. Experimentos na condição de estresse térmico**

Em um dos tubos, o precipitado bacteriano (detalhado no item acima) foi ressuspensado em meio BHI acrescido de Tween® 80 0,05% na temperatura de 50°C e mantido na incubadora tipo shaker por 15 min, a 50°C e 160rpm. Imediatamente após 15 min, foi retirada uma alíquota de 100µL da cultura e outra com 12mL. A primeira foi destinada a diluições seriadas, explicada no tópico 4.4, enquanto a outra alíquota foi destinada a extração do RNA, detalhada no tópico 4.5.

#### **4.3.2. Experimentos na condição de estresse osmótico**

Um dos precipitados bacterianos (item 4.3) foi ressuspensado com o meio BHI acrescido de Tween® 80 0,05% contendo 2M de NaCl, e foi mantido na incubadora tipo shaker por 15 minutos, a 37°C e 160rpm. O procedimento de diluições seriadas e extração do RNA foi o mesmo relatado no item 4.3.1

#### **4.3.3. Experimentos na condição de estresse ácido**

Um dos precipitados bacterianos (item 4.3.1) foi ressuspensionado com o meio BHI acrescido de Tween® 80 0,05% pH 5,0 (suplementado com HCl) e mantido na incubadora tipo shaker por 15 minutos, a 37°C e 160rpm. A partir deste ponto, o procedimento foi o mesmo relatado no item 4.3.1.

#### **4.3.4. Experimentos na condição controle**

Um dos precipitados bacterianos (item 4.3.1) foi ressuspensionado com o meio BHI acrescido de Tween® 80 0,05% e mantido na incubadora tipo shaker por 15 minutos, a 37°C e 160rpm. A partir deste ponto, o procedimento foi o mesmo relatado no item 4.3.1.

#### **4.4. Diluição Seriada e plaqueamento**

Para verificar a viabilidade celular entre as condições expostas neste trabalho, diluições seriadas, a partir de 100µL (itens 4.3.1 – 4.3.4) até a correspondente a  $10^{-6}$  foram realizadas em 900µL de caldo BHI líquido. As diluições correspondentes a  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram posteriormente plaqueadas para os quatro tratamentos. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C até a visualização das colônias, o que corresponde a aproximadamente 48 horas. As UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) para cada réplica, que corresponde duas por placa/por experimento, foram contadas para análise. Os dados de viabilidade foram representados com auxílio do software GraphPad Prism v.5.0.

#### **4.5. Obtenção do material para extração do RNA total**

As alíquotas contendo o volume de 12mL (itens 4.3.1 – 4.3.4) foram retiradas dos tubos de 50mL, distribuídas em tubos de microcentrífugas de 2mL e centrifugadas por 3 minutos a 14.000rpm. Para cada precipitado bacteriano, foram adicionados 2mL de RNAlater® (Ambion, EUA), e depois incubados a

4°C overnight, para estabilização da atividade transcricional e conservação da integridade do RNA. As amostras foram então submetidas à centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos, seguida de descarte do sobrenadante. Os precipitados bacterianos estabilizados foram armazenados em freezer -80°C até o procedimento de extração do RNA total.

#### **4.6. Extração do RNA total**

As culturas estabilizadas com RNAlater® (Ambion, EUA) (item 4.5) foram submetidas à extração de RNA total utilizando o kit comercial *ChargeSwitch® Total RNA Cell* (Invitrogen, EUA) seguindo as recomendações do fabricante com as seguintes adaptações: Após adição do tampão de lise, o material foi transferido para tubos de 2mL parcialmente preenchidos por microesferas de vidro de 1mm de diâmetro (Bertin Technologies, FR). A lise mecânica das células foi feita no homogeneizador Prescellys®24, configurado para agitar os tubos a 6.500rpm por 2 ciclos de 15 s, com intervalo de 30 s entre estes. As amostras foram então centrifugadas por 1 min e o sobrenadante dos tubos transferido para novo tudo de 2mL e incubadas em banho seco a 60°C por 15 min seguindo todo protocolo original. Quando indicado, foram acrescentadas DNase para a eliminação de DNA genômico residual. A eluição do RNA total presente nas *beads* magnéticas foi feita com 100µL de água mili-Q RNase-Free. A quantidade de RNA total obtido foi avaliada no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA).

#### **4.7. Remoção do rRNA**

Com o objetivo de enriquecer o mRNA presente nas amostras de RNA total, o kit *RiboMinus™ Transcriptome Isolation (Yeast and Bacteria)* da Invitrogen (EUA) foi utilizado para remover o rRNA, seguindo as recomendações do fabricante. O kit suprime o rRNA através da hibridização com sondas magnéticas marcadas com biotina e posterior captura destes complexos por *beads* magnéticas ligadas a estreptavidina.

#### **4.8. Síntese e preparo da biblioteca de cDNA**

O RNA total após a depleção do rRNA foi utilizado para síntese do cDNA seguindo o protocolo padrão do kit *SOLiD™ Total RNA-Seq* (Applied Biosystem, EUA). O material foi quantificado em Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA).

Resumidamente, após a remoção dos RNA ribossomais, o RNA foi fragmentado pela RNase III, através de incubação em um termociclador a 37°C por 10 minutos, e interrompida pela adição de 90µl de água sem nuclease. O RNA foi concentrado através da precipitação por etanol segundo *RiboMinus™ Concentration Module* (Invitrogen-EUA). Para hibridização com adaptadores e posterior preparação de amplificação da biblioteca de cDNA, produzidos por transcrição reversa, a partir de adaptadores P1 ligados à extremidade das moléculas de RNA, conforme protocolo *SOLiD™ Total RNA-Seq Kit* (Applied Biosystem, EUA). Após esta etapa, preparou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% para recuperação de fragmentos na faixa de 150 a 250 pares de base para amplificação do cDNA através de uma PCR. A amplificação foi realizada em um termociclador através de 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, sucedidos por incubação a 72°C por 7 minutos. Após a amplificação do cDNA, o material foi purificado com o kit *PureLink™ PCR Micro* (Invitrogen, EUA), quantificado em *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, EUA) e confirmado através de eletroforese de agarose 2%. As amostras foram então ajustadas para uma concentração de 60pg/mL, sugerida para a PCR em emulsão.

#### **4.9. Preparo das microesferas para o sequenciamento**

A emPCR em grande escala (150 a 300 milhões de microesferas de interesse) utiliza primers complementares aos adaptadores P1 das microesferas, conforme os fabricantes da *Applied Biosystems SOLiD™ 3 Plus System Templated Bead Preparation Guide*.

Esta amplificação consiste na fase oleosa e aquosa, que são preparadas separadamente, e depois ocorre a emulsificação utilizando o sistema *ULTRA-*

*TURRAX™ Tube Drive* da IKA®, de forma a gerar microgotículas de fase aquosa no interior da emulsão (micro-reatores). Após 5 minutos de emulsificação a reação foi distribuída em placas de 96 poços e levadas ao termocilador. A amplificação foi realizada em um termociclador através de 40 ciclos de 93°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 75 segundos, sucedidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Ao término da reação de emulsão, uma reação de enriquecimento foi feita, onde apenas as microesferas com fragmentos inseridos são capturadas. Em seguida, correu-se a WFA (*workflow analysis*) onde 15.000.000 dessas microesferas foram depositadas em lâminas e passaram por um ciclo de ligação para avaliação de quantidade e qualidade. Com base nesta avaliação, 44.000.000 de microesferas foram depositadas para o sequenciamento conforme descrição do fabricante, produzindo leituras de 50 nucleotídeos.

#### **4.10. Análise dos dados**

Os dados brutos oriundos do sequenciamento foram convertidos do formato .csfasta para o formato .fasta, e em seguida foram submetidos ao montador Velvet versão 1.2.10 (ZERBINO e BIRNEY, 2008). Para cada um dos dados brutos, correspondentes a cada condição aplicada, uma montagem foi realizada com os valores de k-mer 27, 29, 31, 33, 35, com os parâmetros *default* do Velvet.

Cada uma dessas montagens gerou um arquivo final de *contigs*, esses arquivos foram submetidos ao Oases versão 0.2.8 (SCHULZ et al., 2012), onde foi realizada a montagem dos transcritos. A união dos resultados dos diferentes k-mers foi feita e uma nova montagem processada. Esta nova montagem foi realizada utilizando o kmer 31, junto com o parametro -long do Oases.

Com os transcritos montados, foi realizado um blast local dos transcritos contra as CDS da referência Cp258, além disto, utilizou-se os resultados de anotação do Blast2go para as CDS de *C. pseudotuberculosis* 258.

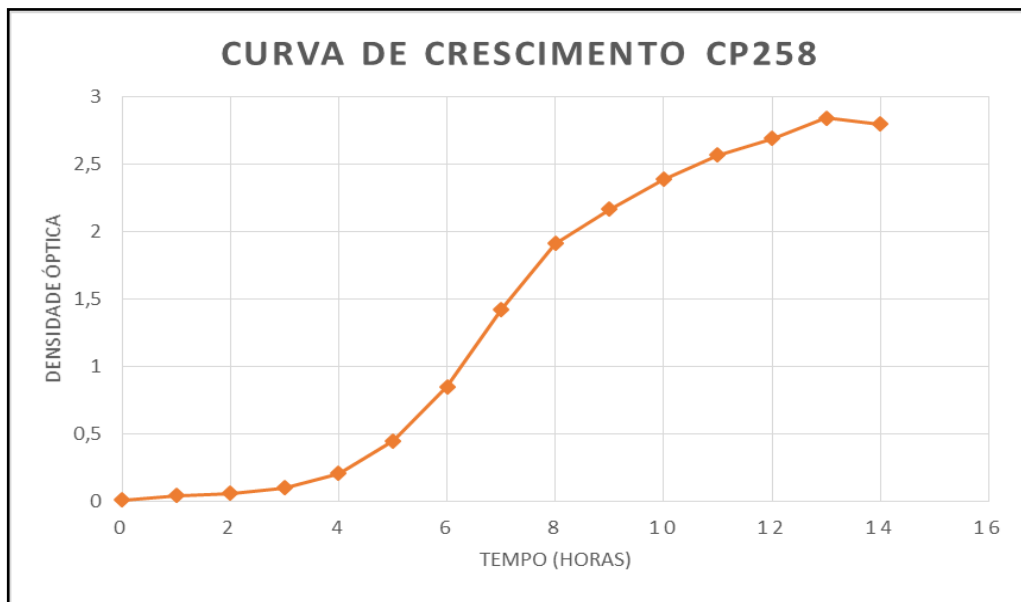
Os transcritos montados, o resultado do Blast (transcritos Vs CDS) e o resultado do Blast2go foram utilizados como *input* para o programa coreStlmulon (CSI). Através do qual foi possível gerar os gráficos e tabelas

organizados, nas categorias GO de “processo biológico”, “componente celular”, “função biológica”, no nível 4. Os relatórios com os transcritos dos “processos biológicos”, das quatro condições analisadas e outro contendo todos os transcritos com hits no nível 4, foram analisados e comparados entre si. A escolha pelo nível 4 ocorreu devido a presença de genes relacionados a resposta aos estresses ácido, térmico e osmótico.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Curva de crescimento *C. pseudotuberculosis* 258

A curva de crescimento da linhagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* 258 está representada na figura 4. A densidade óptica foi medida por hora, durante um período de 14 horas. O valor escolhido para a aplicação dos estresses foi o a  $DO_{600nm} = 0,2$ . Este valor representa o início da fase exponencial.



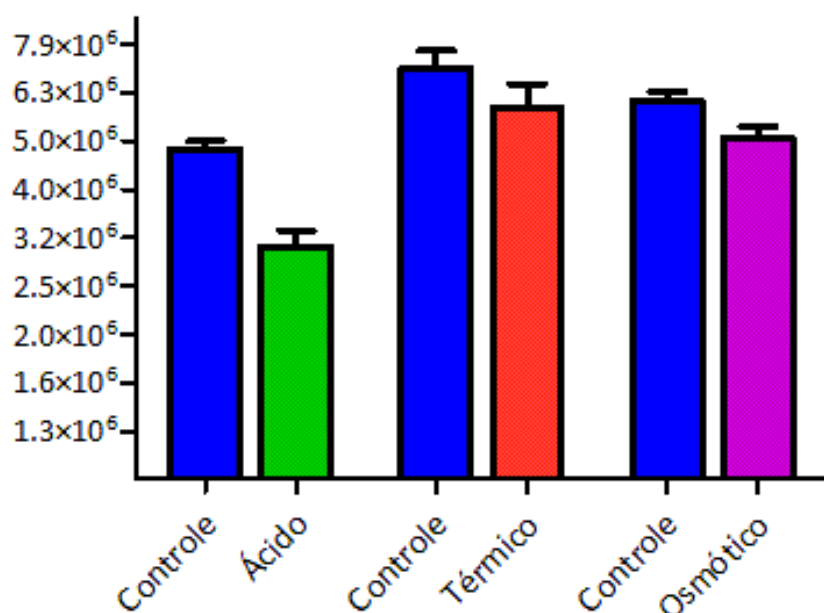
**Figura 4: Curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258.** Densidade óptica de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) da condição controle de Cp258 medidas durante 14 horas. Os quadrados indicam os valores da  $DO_{600nm}$  obtidos a cada hora.

### 5.2. Avaliação da susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* nas diferentes condições de estresse aplicadas

As condições de estresse ácido (pH), térmico ( $50^{\circ}C$ ), e osmótico (2M) foram aplicadas com o objetivo de compreender a reação da bactéria, no início da fase exponencial de crescimento. Estes diferentes ambientes abióticos simulam as condições apresentadas pelo hospedeiro no processo infeccioso, e foram posteriormente comparados a condição fisiológica de cultivo. Para isso,

os agentes geradores de estresse foram aplicados conforme descrito nos itens 4.3.1; 4.3.2 e 4.3.3. E a susceptibilidade foi avaliada através das diluições seriadas relatadas no item 4.4. Através deste experimento de viabilidade celular, foi possível inferir que houve uma redução na replicação em torno de 36% no estresse ácido, 20% no térmico, e 16% no osmótico, quando comparados ao controle (condição fisiológica). Este resultado pode ser visualizado na figura 5. O valor médio de células viáveis, obtido por condição, pode ser melhor visualizado na tabela 1.

### Número de células viáveis em cada condição testada



**Figura 5: Número de células viáveis em cada condição testada.** Número de colônias obtidas no experimento de viabilidade celular. Pode-se observar uma redução na replicação em torno de 36% no estresse ácido, 20% no térmico, e 16% no osmótico, em relação ao controle.

### Número de células viáveis em cada condição testada

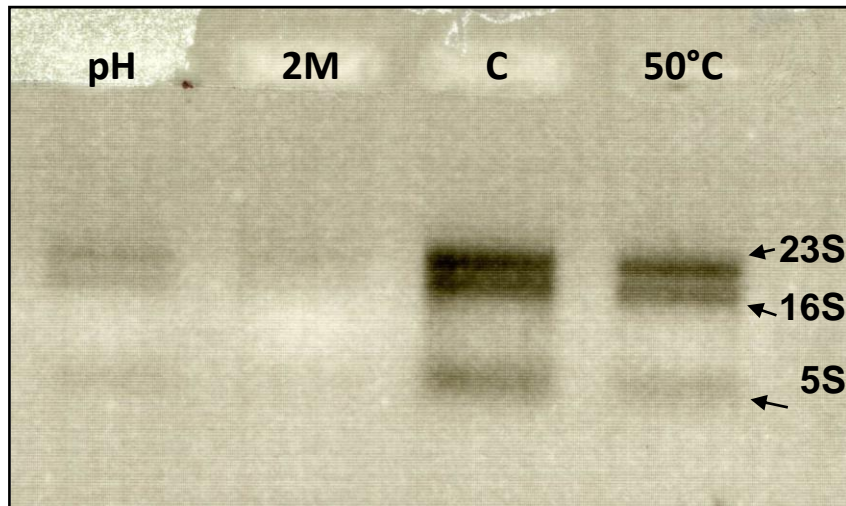
	TÉRMICO	OSMÓTICO	ÁCIDO
<b>CONTROLE</b>	6,6 X 10 <sup>7</sup>	6,34 X 10 <sup>7</sup>	4,78 X 10 <sup>7</sup>
<b>ESTRESSE</b>	5,37 X 10 <sup>7</sup>	5,3 X 10 <sup>7</sup>	3,045 X 10 <sup>7</sup>

**Tabela 1: Média obtida por condição.** Comparação da média obtida pelos controles e cada estresse.



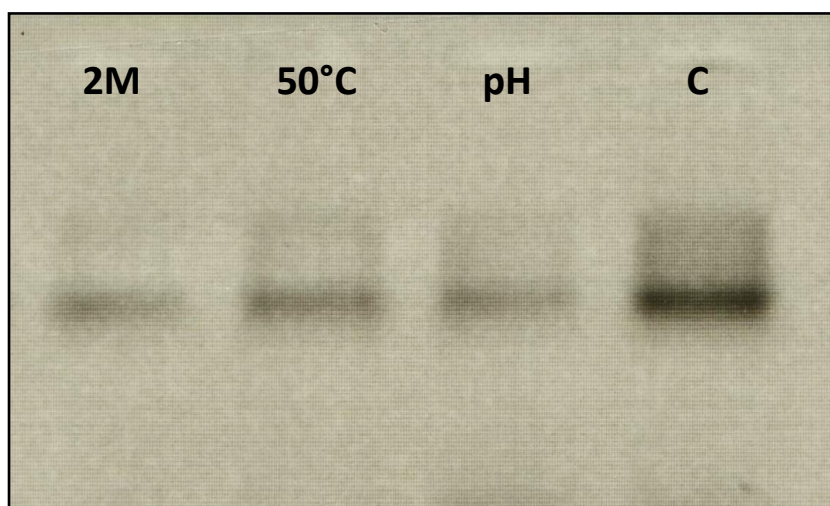
### 5.3. Extração do RNA total de *C. pseudotuberculosis*

O RNA total foi obtido de acordo com a metodologia exposta no item 4.6. A integridade do RNA total e a remoção do DNA via tratamento com DNase, podem ser observados na figura 6. As duas bandas nítidas presentes no gel representam os RNAs ribossomais 23S, 16S e 5S, respectivamente.



**Figura 6: RNA extraído após tratamento com DNase.** Para a extração do RNA bacteriano foi utilizado o kit comercial da Invitrogen. Após a extração do RNA das condições ácida (pH), osmótica (2M), controle (C) e térmico (50°C), um gel de agarose foi realizado para verificar a integridade e presença do material biológico e é possível verificar a presença das bandas de rRNA 23S e 16S.

Após a depleção (descrita no item 4.7), a banda correspondente ao 16S ainda pode ser visualizada nitidamente, enquanto uma maior quantidade do rRNA 23S foi removido (figura 7). Através deste resultado, foi confirmado a remoção dos rRNAs, e devido ao fato do kit utilizado garantir uma remoção de 95%, uma quantidade significativa dos ribossomais ainda é esperada. Isto por que, como mencionado anteriormente, os mesmos correspondem a cerca de 80% dos transcritos de uma célula (WESTERMANN et al., 2012).



**Figura 7: RNA extraído após remoção dos rRNAs.** Após a depleção dos rRNAs é possível verificar a diminuição da quantidade inicial de ribossomais, mas como o kit não garante 100%, ainda é possível verificar a presença da banda correspondente ao 16S. Condições ácida (pH), osmótica (2M), controle (C) e térmica (50°C).

#### 5.4. Processamento dos dados do SOLiD™

Após a remoção dos ribossomais, os materiais biológicos foram preparados para o sequenciamento, utilizando kits comerciais para a plataforma SOLiD™. Os dados brutos do sequenciamento foram utilizados na montagem com o software Velvet. O número total de reads e bases obtidas para cada condição estão na tabela 2. Dentre esses, a condição térmica foi a mais representada, entre os estresses.

	TOTAL DE READS	READS MAPEADAS	TOTAL DE BASES
<b>pH</b>	14.301.057	11.851.744	715.052.850
<b>50°C</b>	18.240.660	6.822.076	912.033.000
<b>2M</b>	12.259.780	1.182.943	612.989.000
<b>C</b>	22.766.509	15.271.603	1.138.325.450

**Tabela 2: Dados brutos do sequenciamento.** Condições ácida (pH), térmica (50°C), osmótica (2M), e controle (C).

No final da montagem dos transcritos, os arquivos gerados foram submetidos ao Blast e ao Blast2go (nível 4) para posterior organização dos processos biológicos no software CSI.

Os valores de N50 o número de bases e de *contigs* obtidos, e os tamanhos do maior e do menor *contig* (sequências contíguas) foram representados na tabela 3, para as condições ácida (pH), térmica (50°C), osmótica (2M) e controle (C), e são indicativos da qualidade da montagem (MILLER et al., 2010). N50 representa o tamanho da menor sequência de um conjunto de *contigs*, que contém o menor número de *contigs* cujos tamanhos somados representam 50% da montagem. A alta cobertura é atingida quando a montagem apresenta um número baixo de *contigs*, um alto valor de N50, e conseqüentemente, um valor alto do tamanho do maior *contig*.

	N50	MAIOR CONTIG	MENOR CONTIG	NÚMERO DE CONTIGS	BASES
<b>pH</b>	156	2.001	100	3.465	564.280
<b>50°C</b>	135	1.047	100	1.853	270.398
<b>2M</b>	121	353	100	186	23.927
<b>C</b>	155	1.139	100	4.891	786.749

**Tabela 3: Parâmetros da montagem:** Condições ácida (pH), térmica (50°C), osmótica (2M) e controle (C)

### 5.5. Análise dos softwares Blast, Blast2go e CSI

Após os dados serem processados pelos softwares Blast, Blast2go e CSI, foi possível gerar os gráficos dos “processos biológicos” de cada condição, os quais estão plotados abaixo, e as listas contendo as respectivas CDSs pertencentes a cada processo estão em anexo. Através desses resultados foi possível caracterizar os *stimulons* ácido, térmico e osmótico de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, e neste tópico os *stimulons* serão abordados, de forma geral, focando nas principais características obtidas.

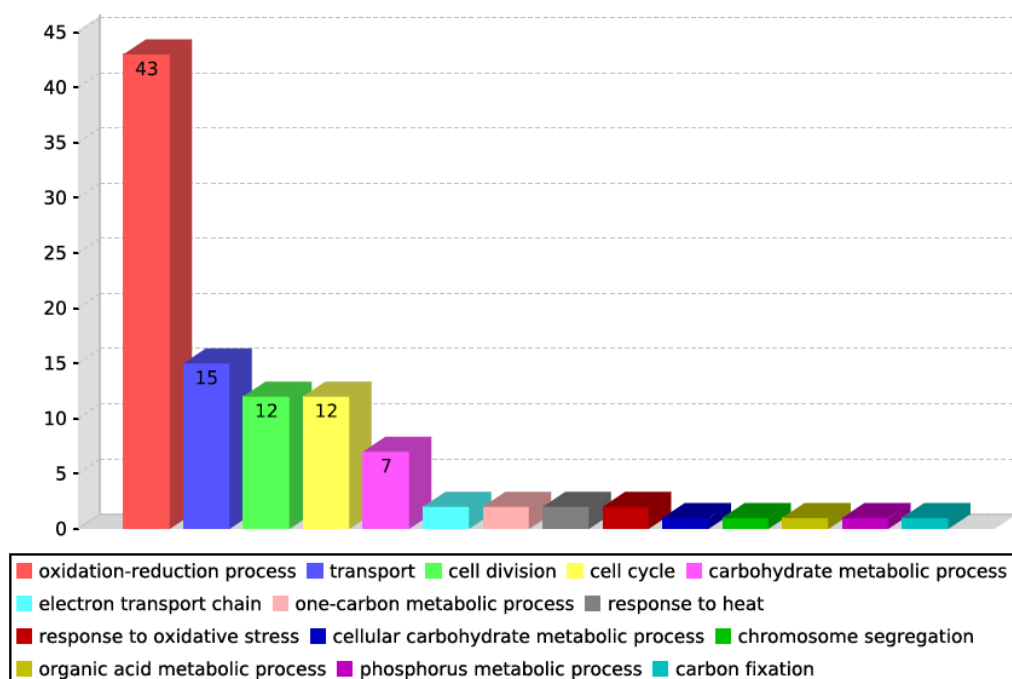
O número de transcritos representados em cada condição foi comparado com os dados obtidos na condição fisiológica de cultivo, e em todas as três

condições adversas houve uma queda na quantidade de transcritos representados, demonstrando uma redução da viabilidade da bactéria.

É importante ressaltar que muitos dos genes representados nos *stimulons* ou estão presentes somente no(s) estresse(s) ou somente na condição fisiológica, o que indica um perfil diferenciado entre as condições. Diante disso, uma comparação entre as quatro condições testadas também foi realizada, utilizando o gráfico de Venn.

### 5.5.1. *Stimulon* ácido

Na condição ácida (figura 8) obteve-se 102 CDSs, sendo 43 do processo de “óxido redução”. Outras categorias marcantes foram a de “transporte” (15 CDSs), “divisão celular” e “ciclo celular” (12 CDSs cada), “resposta ao choque térmico” (2 CDSs) e ‘resposta ao estresse oxidativo” (2 CDSs). A lista contendo todas as CDSs transcritas nesta condição e que foram catalogadas pelo Blast2go nível 4 na categoria GO “processo biológico” estão no anexo A.



**Figura 8: Gene Ontology por processo biológico (nível 4) - *Stimulon* ácido.** Processos biológicos representados na legenda estão na mesma ordem do gráfico.

Este *stimulon* foi o mais representado entre os estresses abióticos, exibindo cerca de 62% dos transcritos obtidos pelo Blast2GO nível 4 (anexo E). O processo de “óxido redução” foi o que apresentou mais transcritos, e exibiu uma queda de 32%, na quantidade de CDSs, em relação a condição fisiológica (anexo D). Apesar desta diminuição, um número significativo de genes foi transcrito, sendo que muitos dos que possivelmente foram totalmente reprimidos, ou seja, não foram representados nesta condição mas estão presentes no controle, possuem funções sobrepostas ou estão envolvidos com outros estresses.

Os dois genes descritos no processo de “resposta ao estresse oxidativo” estão descritos no *stimulon* ácido. Este resultado confirma os dados de Follmann e colaboradores (2009), que observaram que o estresse ácido estimula a presença de genes envolvidos na resposta oxidativa.

As CDSs envolvidas no processo de “resposta ao choque térmico” também estão presentes neste *stimulon*, e como já mencionado, HSPs também são ativadas em resposta as alterações de pH (TRAN et al., 2006). Esses genes codificam chaperonas importantes no (re)dobramento de proteínas, e considerando que a solubilidade de diferentes compostos é afetada, em pH elevado, a ação dessas enzimas é de extrema importância para a viabilidade celular.

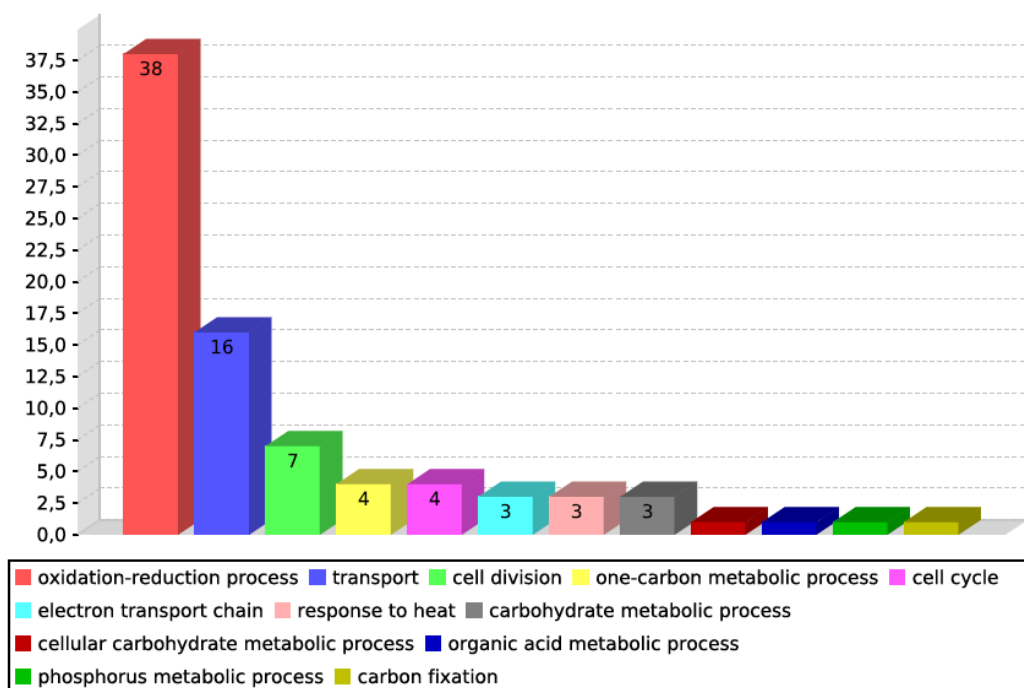
Os genes envolvidos nos processos de “ciclo celular” e “divisão celular” foram menos expressos em pH ácido, ao comparar com a condição fisiológica (anexoD), havendo uma queda de cerca de 30%, em ambos. Este resultado já era esperado, uma vez que houve uma diminuição na replicação celular nesta condição, segundo os dados obtidos de contagem de colônias. O que é reforçado pela queda de 20% das CDSs envolvidas nos processos metabólicos, no estresse ácido, comparado à condição fisiológica (anexoD).

Na resposta diante desse estresse, *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, demonstrou ter uma defesa eficiente, uma vez que ativou diferentes genes envolvidos na resposta ao estresse, mas ao considerar os resultados da avaliação da susceptibilidade (item 5.3), o estresse ácido apresentou a maior queda do número de colônias obtidas, comparado aos outros estresses aplicados. Possivelmente, para sobreviver a esta condição, a bactéria diminuiu seu crescimento e ativa a expressão de genes relacionados ao escape, outro

fato que pode ter contribuído para o número de transcritos foi a alta cobertura obtida após a montagem.

### 5.5.2. *Stimulon* térmico

O *stimulon* térmico (figura 9) exibiu 82 CDSs, sendo 38 do processo de “óxido redução”. Este *stimulon* também apresentou CDSs envolvidas no processo de “resposta ao choque térmico” (3), “transporte” (16), “divisão celular” e “ciclo celular” (7 e 4, respectivamente). A lista com os transcritos do *stimulon* estão no anexo B.



**Figura 9: Gene Ontology por processo biológico (nível 4) - *Stimulon* térmico.** Processos biológicos representados na legenda estão na mesma ordem do gráfico.

Neste estudo, o *stimulon* térmico foi marcado pela presença de HSPs, que de forma geral, compõem o centro da resposta à alta temperatura. Muitos genes são regulados por elas, de forma direta ou indireta, além de serem importantes na manutenção das funções de proteínas (WEIBEZAHN et al., 2004).

Os resultados deste estudo concordam com os de Han e colaboradores (2005), no que diz respeito aos processos induzidos e totalmente reprimidos, em resposta ao estresse térmico. Ao considerar todos os processos metabólicos presente no *stimulon*, observou-se uma queda de 33% das CDSs, ao comparar com a condição fisiológica (anexo D), e esta queda sobe para 58% considerando somente o processo de “biossíntese de carboidratos”. Em outros processos, como “divisão celular” e “ciclo celular”, a queda no número de transcritos é de 59% e 72%, respectivamente, comparada à condição fisiológica (anexoD). Esses resultados condizem com a diminuição da replicação de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, na condição térmica, e provavelmente os esforços, que foram gastos nestes processos, na condição fisiológica (anexo D), foram relocados para funções que visam a sobrevivência da bactéria.

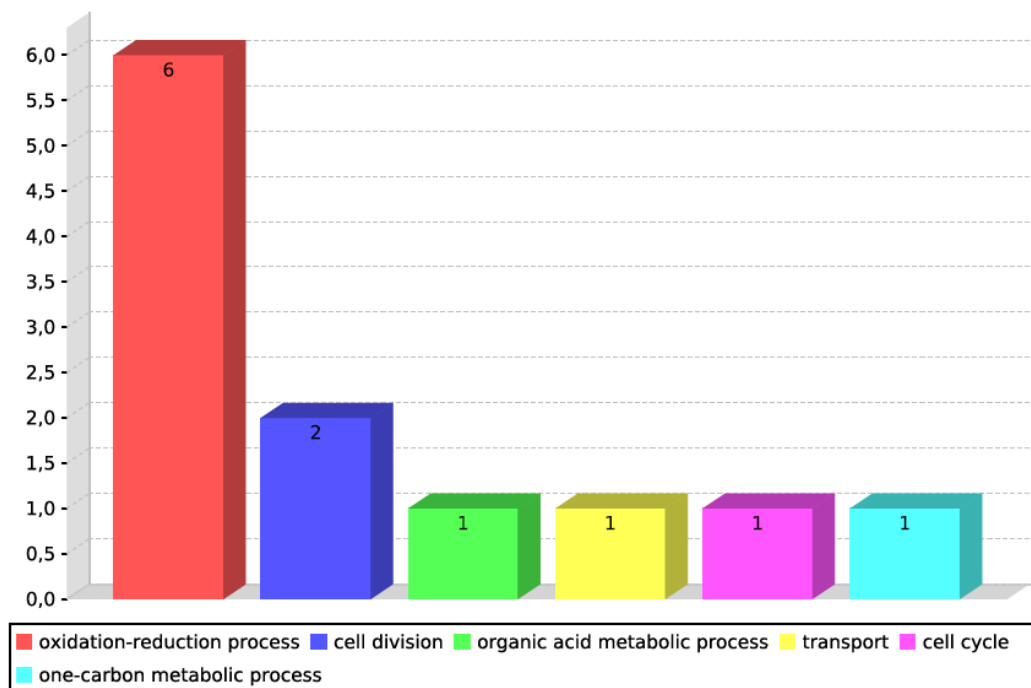
Todas as CDSs relacionadas ao processo de “resposta ao choque térmico”, obtidos neste trabalho (anexo E), foram transcritas neste *stimulon*. Dos três genes envolvidos no processo de “resposta ao choque térmico”, apenas dois estão presentes na condição fisiológica. Outros estudos serão necessários para verificar a expressão diferencial destes genes, e assim indicar se houve uma indução ou repressão dos mesmos, na condição térmica.

Em relação aos processos de “óxido redução”, houve uma queda de 40%, em relação aos transcritos obtidos na condição fisiológica (anexo D). Este processo foi o mais representado do *stimulon* térmico, assim como ocorreu no *stimulon* ácido. Também foi observado que muitos dos genes ausentes nesta condição, mas presentes nas demais, possuem funções sobrepostas a outros genes descritos neste *stimulon*, outro ponto em comum em relação a este processo nos *stimulons* ácido e térmico.

Genes importantes, envolvidos principalmente no processo de “óxido redução”, estão presentes neste estresse, estes estão envolvidos na proteção do microrganismo contra ROS, biossíntese da parede, aquisição de ferro. Estudos específicos serão necessários para melhor compreender a dinâmica do *stimulon* e principalmente de alguns genes que serão descritos neste trabalho.

### 5.5.3. *Stimulon* osmótico

O *stimulon* osmótico (figura 10) apresentou 12 CDSs, sendo que metade corresponde ao processo de “óxido redução”. Os outros processos caracterizados foram “divisão celular”, processo “metabólico de ácidos orgânicos”, “transporte”, “ciclo celular” e processo “metabólico de um-carbono”, e. O anexo C contém todos os transcritos presentes neste *stimulon*.



**Figura 10: Gene Ontology por processo biológico (nível 4) - *Stimulon* osmótico.** Processos biológicos representados na legenda estão na mesma ordem do gráfico.

Este *stimulon* foi o menos representado entre os estresses, com um total de doze transcritos. Metade desses estão no processo de “óxido redução”, simbolizando uma queda de cerca de 90%, em relação a condição fisiológica. Dois genes estão presentes no processo de “divisão celular”, e um no “ciclo celular”, demonstrando uma queda de 88% e 93%, respectivamente, em relação a condição fisiológica. Os genes envolvidos nos processos metabólicos também foram pouco expressos, havendo uma queda de 87%, em relação a condição fisiológica.

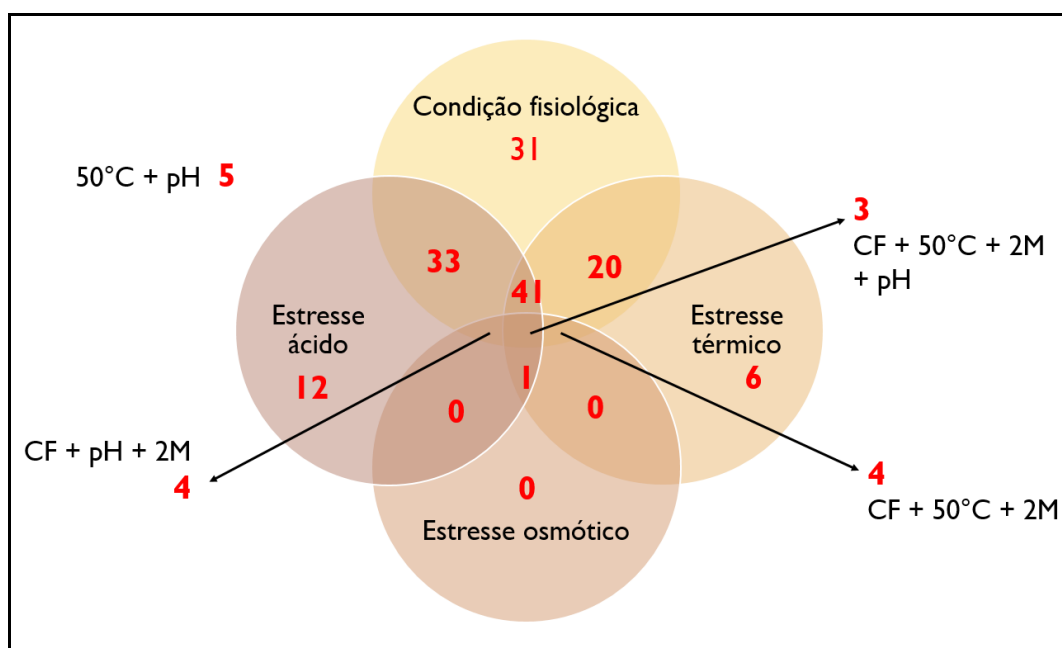
Os resultados expostos neste estudo indicam que o estresse osmótico é danoso a esta linhagem, uma vez que poucos genes de resposta ao estresse



foram ativados. Porém, não se descarta a possibilidade de erro técnico, durante a montagem do experimento, e por isso se faz necessário a repetição do experimento em pesquisas futuras.

#### 5.5.4. Comparação entre os estresses

Todos os transcritos relacionados com a categoria GO “processo biológico” foram plotados no gráfico de Venn, separadas pelas condições que foram transcritas (figura 11). De acordo com os resultados demonstrados na figura 11, podemos destacar os transcritos obtidos somente nas condições de estresse ácido, térmico e osmótico (12, 6 e 0, respectivamente); e os obtidos em duas ou mais condições de estresse, como os 5 transcritos representados nas condições ácida e térmica, e 1 transcrito presente nas três condições de estresse.



**Figura 11: Gráfico de Venn contendo todos os transcritos relacionados com a categoria GO “processo biológico” (nível 4) separados por condição.** Os valores representados no gráfico simbolizam o número de transcritos obtidos em cada ou conjunto de condições de estresse testadas (ácida, térmica e osmótica) e a condição fisiológica de cultivo.

## 6. DISCUSSÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, assim como qualquer outro patógeno intracelular, modifica a expressão de seus genes durante a infecção. Isto por que, as condições ambientais nas quais o organismo está exposto mudam radicalmente. Com o intuito de eliminar o organismo estranho, o sistema imune do hospedeiro ataca o invasor, o que ocorre principalmente através dos macrófagos. Dentro do fagolisossomo (bactéria + macrófago + lisossomo), o ambiente celular é considerado inóspito para a bactéria, e por isso, uma variedade de genes são ativados, com o objetivo de diminuir os danos, e garantir a sobrevivência do patógeno (HAN et al., 2005).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar os transcritos gerados a partir das metodologias de RNA-seq, montagem *ab initio* e blast. Uma análise de presença e ausência dos transcritos de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, expressos no início da fase exponencial de crescimento ( $DO_{600nm} = 0,2$ ), foi realizada em condições simuladas de estresses abióticos e condição fisiológica. Os estresses ácido, térmico e osmótico foram selecionados por terem sido estudados na linhagem 1002 da espécie *C. pseudotuberculosis*, e por serem condições bastante estudadas, que ocorrem no fagolisossomo, durante a infecção pela bactéria.

Entre os genes ativados pela bactéria, durante a fagocitose, destacam os codificadores das proteínas relacionados com fatores de virulência, como a PLD, lipídios da parede, genes envolvidos com transporte de ferro, além das HSPs.

Alguns genes induzidos, nas condições de estresse, também são transcritos na condição fisiológica de cultivo. E este fato não diminui a possibilidade de serem fatores de virulência ou estarem envolvidos em processos responsáveis pela manutenção da bactéria no meio. Os genes envolvidos, por exemplo, com a resposta ao estresse térmico, são transcritos, de forma basal, como método preventivo (GOPHNA e RON, 2003).

Em nosso estudo também observamos transcritos que possivelmente são essenciais para a sobrevivência tanto em condições de estresse como na condição fisiológica, como os envolvidos na síntese da parede celular e na

proteção contra ROS. No geral, entre os resultados obtidos pelo Blast2go e organizados pelo CSI, os processos de “óxido redução”, “transporte”, “divisão celular” e “ciclo celular” foram os mais representados, ou seja, aqueles que obtiveram o maior número de genes envolvidos na resposta contra a perturbação ambiental. Outros processos importantes que podemos ressaltar seriam os de “resposta aos estresses oxidativo” e “resposta ao choque térmico”.

Todos os transcritos, selecionados por este trabalho, estão descritos nas figuras 8, 9 e 10, e aqueles que apresentaram maior relevância para a sobrevivência do microrganismo serão discutidos e relacionados. Primeiramente, alguns genes relacionados serão tratados, e apesar dos transcritos integrarem processos diferentes, serão discutidos em conjunto, pois compõem uma cascata de eventos, durante a resposta ao estresse. Dois casos serão tratados no tópico de “genes envolvidos em uma mesma rede de regulação”, e esta separação foi realizada para facilitar a compreensão do vínculo existente entre as chaperonas e genes regulados por elas; e também a relação dos transcritos envolvidos na síntese e transporte da glicina betaína, um osmoprotetor. E, para finalizar, os transcritos obtidos pelo Blast2go (anexo E) serão discutidos, dentro do processo que foram designados, exceto aqueles tratados no caso anterior.

Com o intuito de comparar as respostas ao estresse, dos dois biovares de *C. pseudotuberculosis*, os resultados deste estudo serão comparados com o trabalho de Pinto e colaboradores (2012).

### **6.1. Genes envolvidos em uma mesma rede de regulação**

Neste tópico, como mencionado acima, serão retratados os genes que apesar de estarem em processos diferentes, eles se interagem fisicamente ou em cascata de reações, para atingirem objetivos em comum.

Dois subtópicos são expostos. O primeiro descreve a ação de chaperonas e genes regulados por elas. Os genes envolvidos codificam HSPs que se interagem, tanto nas condições de estresse como na fisiológica, para diminuir os danos causados pelo ambiente ou na manutenção e prevenção

das atividades celulares. Estes transcritos estão presentes nos processos de “óxido redução” e “resposta ao choque térmico”.

O segundo caso detalha um grupo de enzimas envolvidas na síntese de glicina betaína, um soluto compatível importante na resposta ao estresse. Genes envolvidos no transporte de precursores auxiliam desidrogenases, do processo “óxido redução”, na diminuição dos efeitos tóxicos dos estresses.

### 6.1.1. Chaperonas e genes regulados

Chaperonas são proteínas que auxiliam o dobramento protéico, através da hidrólise de ATP, e caso não atinjam a configuração correta, a proteína é encaminhada à destruição (BUKAU et al., 2000). Entre as mais estudadas está a DnaK (Cp258\_1915) também conhecida como Hsp70 (*heat shock protein 70*). Esta proteína interage diretamente com outras quatro chaperonas DnaJ (Cp258\_1534), GrpE (Cp258\_1914), ClpB (Cp1889) e cofator 1 (Cp1913); e também com a proteína HspR (Cp258\_1912) (SCHRÖDER et al., 1993). As últimas duas foram transcritas nas condições ácida/fisiológica e ácida, respectivamente, e pelos dados do Blast2go foram representadas no processo biológico “resposta ao estresse”, no nível 3 (anexo F). Como mencionado, a escolha do nível 4 ocorreu pela presença massiva de genes e processos relacionados com os estresses, mas o nível de detalhamento dos processos biológicos não permitiu que as proteínas GrpE e HspR fossem retratadas no nível 4. No entanto, como há uma interação com genes reportados nesta sessão, e por serem consideradas relevantes ao trabalho, elas foram consideradas e serão discutidas neste tópico.

As chaperonas são subdivididas em dois tipos: *holder* e *folder* (MOGK et al., 1999). As do primeiro caso previnem a agregação e mal dobramento de proteínas, enquanto as do segundo auxiliam no dobramento de proteínas recém sintetizadas e no redobramento das que sofreram alterações, e por isso estão mal dobradas. A DnaK é a principal *holder* citosólica, em bactérias, dissolvendo agregados de RNA polimerase e DnaA, mas também age como *folder*, em um sistema bi-chaperona com ClpB (MOGK et al., 1999; WEIBEZAHN et al., 2004; ZOLKIEWSKI, 1999). Mogk e colaboradores (1999)

identificaram que diferentes proteínas são protegidas pela DnaK, em altas temperaturas, e estas basicamente estão envolvidas na divisão celular, na transcrição e tradução. Os autores também observaram que durante esta condição há uma diminuição na síntese de proteínas, e conseqüentemente aumentando o número de chaperonas disponíveis para a prevenção e redobramento de proteínas. A presença massiva de proteínas mal dobradas é danosa à célula, e leva a morte celular, devido aos efeitos tóxicos das mesmas nas funções celulares e formação de agregados entre as proteínas, ocasionando a perda da função (WEIBEZAHN et al., 2004). E segundo os autores, a degradação destes agregados não é suficiente para garantir a sobrevivência, e que a ação das proteínas envolvidas na solubilização, redobramento e conseqüente reativação destas proteínas são preferidas à ação das proteases.

ClpB é o componente central na solubilização, para posterior redobramento, função favorecida *in vivo*. Ela age em conjunto com a DnaK, DnaJ e GrpE, e possivelmente também atuam impedindo que as proteínas recém dissociadas se associem novamente (WEIBEZAHN et al., 2004). Na ausência das proteínas citadas acima, GroEL e GroES assumem como chaperonas principais e promovem a quebra dos agregados, o dobramento e redobramento de proteínas (MOGK et al., 1999). Essas funções ficam comprometidas ou não ocorrem em condições de estresse térmico (44°C e 50°C, respectivamente), provocando uma morte celular mais rápida (MOTOHASHI et al., 1999).

A proteína HspR é uma reguladora negativa, na resposta ao estresse térmico, e em muitas bactérias ela juntamente com DnaK, DnaJ e GrpE constituem um operon (EHIRA et al., 2009). Os autores também identificaram que, em *C. glutamicum*, HspR regula negativamente seu próprio operon e o operon ClpB, pela ligação na sequência HAIR (*HspR-associated inverted repeat*) presente na região promotora. Este sistema HspR/HAIR apresenta uma relação repressor/operador em uma variedade de bactérias (ANDERSEN et al., 2005). Sob condições de estresse ambiental, o complexo HspR e DnaK se desfaz, pois a última é requerida para o dobramento das proteínas afetadas.

HspR também pode ser relacionada a sensibilidade ao oxigênio, além de ser importante na invasão e adesão, por afetar genes relacionados a

mobilidade de *Campylobacter jejuni* (ANDERSEN et al., 2005). Os autores também observaram a importância desse gene em altas temperaturas, pois quando mutado a bactéria não formou colônias na condição de 44°C. O mesmo não foi constatado, em estudos com *M. tuberculosis*, pois o mutante demonstrou ser mais resistente a altas temperaturas que a linhagem selvagem (STEWART et al., 2001). Neste trabalho, os autores identificaram que a expressão elevada tanto de HspR como de DnaK possuem um efeito danoso à bactéria, e auxilia o hospedeiro a identificar e eliminar o patógeno.

Outra chaperona descrita neste trabalho foi o cofator 1, mas pelos dados da literatura não foi possível identificar uma função específica a esta proteína, apenas que sua presença intensifica a ação de outras chaperonas, como a DnaK, e por isso sua presença se deve, provavelmente, a presença de proteínas “mal dobradas” devido a ação dos agentes de estresse (DEMAND et al, 1998).

Neste estudo, com exceção de GrpE e HspR todas as demais chaperonas agem na condição de estresse térmico, e todas, com exceção do cofator 1, são transcritas durante o estresse ácido. Isso demonstra a importância destes complexos na resposta ao estresse. Como mencionado anteriormente, o estresse ácido afeta a solubilidade de diversos compostos e por isso a ação de chaperonas é de extrema importância para a manutenção da homeostase. O mesmo pode ser dito sobre o estresse térmico, mas a ausência de transcritos dos genes *grpE* e *hspR* pode ser explicada ou pela presença de proteínas que sobrepõem suas funções, ou por não serem essenciais para a sobrevivência do patógeno neste estresse. Stewart e colaboradores (2001) já demonstraram que a ação de HspR não é primordial para *M. tuberculosis*, em altas temperaturas, e em condições extremas a energia e esforços celulares precisam ser direcionados para a sobrevivência no hospedeiro.

Em *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002 apenas os transcritos referentes a DnaK e GrpE foram representados, e ambos estão presentes em todos os estresses. Os dados obtidos por Pinto e colaboradores (2012) e os resultados apresentados neste trabalho sugerem a importância dos mesmos para a viabilidade e patogenicidade na espécie. Estudos de expressão diferencial e mutacionais auxiliariam o melhor entendimento das HSPs, assim como a ação dos mesmos durante um processo infeccioso.

### 6.1.2. Aquisição de glicina betaína como osmoprotetor

O aumento da osmolaridade no ambiente externo possui um efeito negativo na proliferação do patógeno no hospedeiro. Para a manutenção do turgor celular, devido à pressão externa, o organismo utiliza de mecanismos (*regulons* contra estresse) para diminuir esta pressão e também a perda de água (SKJERDAL et al., 1995, 1996; WHATMORE et al., 1990). O combate ao estresse foi estudado em *B. subtilis*, e ocorre em via de três passos (BOCH et al., 1996). O primeiro está relacionado à aquisição de íons potássio, mas em altas concentrações este íon é danoso à célula, e por isso outros mecanismos também são necessários (WHATMORE e REED, 1990).

Os passos subsequentes estão relacionados ao conceito de solutos compatíveis, introduzidos anteriormente. Como mencionado eles atuam na proteção dos componentes celulares, além da manutenção do turgor celular, sob todas as três condições de estresse aplicadas neste estudo (osmótico, térmico e ácido) (COSTA et al., 1998). O segundo passo para combater o estresse é o acúmulo de prolina, um osmoprotetor, cujo acúmulo pode ocorrer via síntese ou transporte (WHATMORE et al., 1990).

A terceira resposta é o acúmulo de glicina betaína, um potente soluto compatível utilizado por diversas bactérias e eucariotos (BOCH et al., 1997). Segundo estes autores, seu acúmulo ocorre via síntese, que sucede via transporte de um de seus precursores e posterior ação das enzimas envolvidas na síntese; ou transporte direto do osmoprotetor. Altas concentrações de glicina betaína pouco afeta sua síntese ou transporte, mas é estimulada pela presença de colina (precursor) e pelas condições do meio (BOCH et al., 1996, 1997; ESHOO, 1988). Eshoo (1988) observou também que genes envolvidos na síntese de glicina betaína são regulados em nível transcricional nos estresses térmico e oxidativo, além do osmótico, e que o acúmulo de glicina betaína diminui a concentração de potássio na célula.

Os precursores deste soluto, colina e glicina betaína aldeído, não apresentam atividade osmoprotetora (STYRVOLD et al., 1986), e as enzimas envolvidas na síntese do soluto compatível não são transcritas na condição fisiológica em *E. coli* (POCARD et al., 1997). Colina desidrogenase (Cp258\_1800) e betaína aldeído desidrogenase (Cp258\_1798) convertem

colina para glicina betaína aldeído e glicina betaína aldeído para glicina betaína, respectivamente. Em *C. pseudotuberculosis* 258, algumas proteínas envolvidas no transporte também foram transcritas, como a proteína de ligação glicina betaína (Cp258\_0112), a de transporte glicina betaína (Cp258\_0680), e a de transporte colina de alta afinidade (Cp258\_1800). As duas primeiras já foram descritas em *E. coli* e demonstraram ser induzidas em condições de estresse e reguladas transcricionalmente (ESHOO, 1988).

As proteínas envolvidas foram expressas quase que exclusivamente nas condições de estresse, com exceção Cp258\_0680. O que condiz com a literatura, que os genes relacionados as reações para produção de glicina betaína não são expressos na condição fisiológica. Estes resultados sugerem que, possivelmente, esta via é exclusiva das situações de estresse, uma vez que a ação osmoprotetora de glicina betaína não é necessária em condições fisiológicas.

Bosch e colaboradores (1997) estudando a proteína glicina betaína desidrogenase demonstraram sua importância na síntese desse osmoprotetor. Sua mutação cessa a síntese desse soluto, sugerindo o papel chave dessa enzima, ou seja, outra proteína não exerce essa função. Essa proteína é altamente conservada em bactérias, e de acordo com Styrvold e colaboradores (1986) sua presença estimula o crescimento de *E. coli* mesmo na presença de altas concentrações osmóticas. O que reforça o papel central da osmoregulação para o crescimento e fisiologia das bactérias (ESHOO, 1988).

## **6.2. Genes descritos nos processos de “ciclo celular”, “divisão celular” e “óxido redução”**

Neste tópico será discutido sobre os genes que estão presentes nos processos de “divisão celular”, “ciclo celular” e “óxido redução”. Os transcritos considerados como possíveis fatores de virulência em *C. pseudotuberculosis* 258 (*equi*) serão comparados com os da linhagem 1002 (*ovis*) da mesma espécie.



### 6.2.1. Divisão e ciclo celular

Os genes envolvidos na divisão e ciclo celular, inclusive os envolvidos com a síntese da parede celular, precisam agir em sincronia, para que ocorra a formação de duas células filhas idênticas (VICENTE e ERRINGTON, 1996). Estudos envolvendo principalmente os genes *fts* (*filamentation temperature sensitive*) de *E. coli* foram bastante estudados (ADAMS; ERRINGTON, 2009; ARENDS et al., 2009; ERASO et al., 2014; GILL e SALMOND, 1987; KARIMOVA et al., 2005). De acordo com os autores existem diferenças entre as bactérias Gram positivas e as Gram negativas, no que diz respeito, principalmente, ao modo de ação e regulação das proteínas envolvidas. O modelo Gram positivo utilizado para comparação foi *Bacillus subtilis*, e observou-se que as proteínas envolvidas na divisão são, em grande maioria, diferentes das de *E. coli*. As mesmas são interdependentes para a montagem do complexo, também chamado de divisomo, mas interagem em alguma forma, e dependem da presença de proteínas essenciais (LETEK et al., 2008). Enquanto no modelo Gram negativo, os genes estão dispostos em *cluster dcw* (*division and cell wall*), e existe uma hierarquia entre os genes envolvidos, havendo também uma interação proteína-proteína (PPI) (CORBIN et al., 2007; DAI e LUTKENHAUS, 1992; ERASO et al., 2014; GILL e SALMOND, 1987; KARIMOVA et al., 2005; SCHMIDT et al., 2004).

Dentre as proteínas Fts, a FtsZ (Cp258\_1413) se destaca, pois a mesma é a principal responsável pela formação do septo de divisão ou anel, sendo homóloga da tubulina (ADAMS e ERRINGTON, 2009; KARIMOVA; DAUTIN et al., 2005). Segundo os autores, o anel Z é formado através da polimerização GTP dependente de FtsZ. Eles também observaram que a concentração desta proteína na célula não é significativamente alterada, em diferentes condições ambientais, e quando mutada, duas consequências podem ocorrer: a não formação do septo, levando a mudanças morfológicas na célula como a aparência filamentosa, ou a formação de diversos septos espalhados pela célula. Esta última consequência pode ocorrer também pelo excesso de FtsZ.

Em *C. glutamicum* e *M. tuberculosis* a mutação em *ftsZ* também mostrou ser essencial para a viabilidade celular, uma vez que interrompe a divisão celular. Em *E. coli* e *B. subtilis*, a mutação do gene determina uma forma

filamentosa às bactérias, enquanto *C. glutamicum* e *M. tuberculosis* ou apresentaram uma elongação limitada, ou não ocorre a formação de bactérias viáveis, dependendo do ponto de mutação, mas independente disso, a divisão não ocorre (HETT e RUBIN, 2008; KIJIMA et al., 1998; LETEK et al., 2008). Segundo Hett & Ribum (2008), foram descritos seis promotores para o gene, o que indica que é bastante regulado em nível transcricional.

Outras proteínas interessantes são a FtsW (Cp258\_1318) e FtsK (Cp258\_1281). A primeira está presente apenas em bactérias que possuem peptidoglicano na parede, e sua mutação interfere na elongação da bactéria, o que sugere um papel no transporte de precursores da parede (ADAMS e ERRINGTON, 2009; IKEDA et al., 1989; MERCER e WEISS, 2002). E em outras espécies do grupo CMNR, esta proteína interage com FtsZ, e esta relação é importante para a divisão celular (HETT e RUBIN, 2008). FtsK atua no final da divisão celular e sua função provavelmente está relacionada a translocação das fitas de DNA para as células filhas, e no fechamento do septo (HETT; RUBIN, 2008; SHERRATT et al., 2010). FtsK também foi associada a recombinação (GRAINGE et al., 2011), a resposta SOS e resistência a danos no DNA (WANG e LUTKENHAUS, 1998). Sua mutação possui um efeito danoso à célula, pois gera mudanças na organização dos cromossomos (GRAINGE et al., 2011; SHERRATT et al., 2010).

O complexo FtsE/FtsX (Cp258\_0581 e Cp258\_0582, respectivamente) também possui um papel importante na divisão. A proteína FtsE interage com FtsZ e com FtsX, sendo que a última é associada a ATPase, em *E. coli*, sugerindo uma função na geração de energia para a constrição, pois sua mutação não impede a formação do anel (ARENDS et al., 2009). Em *B. subtilis*, segundo os autores, o complexo não está envolvido na divisão celular, e sim na esporulação.

Existe uma diferença entre as actinobactérias, como *Corynebacterium* e *Mycobacterium*, e as demais bactérias (LETEK et al., 2008). O *cluster dcw* do primeiro grupo de bactérias é reduzido, apresentando somente os genes *ftsZ*, *ftsE*, *ftsX*, *ftsK*, *ftsQ*, *ftsB*, *ftsW*. E, conseqüentemente, não sendo composto por alguns genes essenciais como *ftsA*, *zipA*, *ftsL* e *ftsN*, que estão presentes no outro grupo. De acordo com os autores, a provável expressão elevada dos genes presentes compensaria de alguma forma a ausência dos demais.

Homólogos dos genes omitidos ainda estão sendo pesquisados nesses gêneros, principalmente o de FtsA, proteína estabilizadora do anel Z.

Pelos resultados apresentados neste trabalho, a divisão e o ciclo celular de *C. pseudotuberculosis* da linhagem 258 estão de acordo com o modelo descrito por *C. glutamicum*. Mais estudos são necessários para elucidar estes processos, e compreender a divisão celular neste gênero. O resultado também indica que a bactéria replica de forma mais lenta nas três condições de estresse, pois uma redução no número de transcritos referentes ao gene *fts* implica em replicação lenta, o que condiz com a literatura e com os resultados de susceptibilidade expostos no item 5.2.

Outras proteínas envolvidas neste processo são as Pbp (*penicillin-binding protein*) ou FtsI (Cp258\_1423), envolvidas na síntese de peptidoglicano da parede celular (HAMOEN et al., 2006; STINGELE e MOLLET, 1996); a SepF (Cp258\_1410) que possui um papel na formação do septo de divisão (ADAMS e ERRINGTON, 2009; HAMOEN et al., 2006); a proteína reguladora transcricional MraZ (Cp258\_1426) (ADAMS et al., 2005; ERASO et al., 2014); entre outras envolvidas na síntese da parede (*undecaprenyl pyrophosphate synthase*) (Cp258\_1526 e Cp258\_0730) (LEE e HELMANN, 2013), e no dobramento de proteínas (*trigger factor* Tig) (Cp258\_1603) (DEUERLING et al., 1999; NISHIHARA et al., 2000).

SepF mostrou não ser essencial para o crescimento em *C. glutamicum*, na condição fisiológica (HONRUBIA et al., 2001; LETEK et al., 2008), mas estudos envolvendo diferentes condições de estresse não foram realizados no gênero, e a exata função da proteína ainda não foi elucidada. Em *C. pseudotuberculosis* 1002, SepF foi transcrita em todas as condições de estresse aplicada por Pinto e colaboradores (2012), o que indica sua importância na viabilidade celular em condições adversas. Na linhagem 258 as demais proteínas envolvidas na divisão celular não foram representadas em mais de uma condição de estresse, e por isso a ausência de SepF nas situações térmica e osmótica é compreensível, e indica um crescimento bacteriano lento.

MraZ é uma proteína bastante conservada em bactérias, sendo considerada estável em diferentes temperaturas (4°C-40°C), na presença de detergentes e em ambientes com alterações de sais e pH (ADAMS et al.,

2005). Eraso e colaboradores (2014) demonstraram a importância do gene como regulador transcricional de diferentes genes de *E. coli*, incluindo alguns genes do *cluster dcw*, inclusive ele próprio. *mraZ* é o primeiro gene deste *cluster*, em grande parte das bactérias, e *upstream* a ele se encontra o promotor  $P_{mra}$ . Os autores citados acima observaram que cerca de 23% dos genes transcritos no início da fase log de crescimento são regulados de forma direta ou indiretamente por *MraZ*, incluindo os onze primeiros genes do *cluster dcw*. Estes são regulados negativamente e a provável justificativa é a repressão do promotor de *mraZ* ( $P_{mra}$ ). Este regula seus primeiros 9 genes, em condições fisiológicas, e *MraZ* é capaz de reprimi-lo. Esta proteína regula a expressão gênica por se ligar fortemente ao DNA em diferentes pontos do genoma, incluindo em seu promotor.

Os 23% dos genes regulados no estudo de Eraso e colaboradores (2014) envolvem diferentes categorias biológicas como divisão celular, metabolismo de peptidoglicano, ciclo TCA (Ciclo Ácido Tricarboxílicos). Os resultados obtidos sugerem que *MraZ* age como repressor em condições de estresse e em fases iniciais de crescimento, por sua ausência não afetar significativamente a fase estacionária, além de um possível papel na adaptação e sobrevivência celular.

Os estudos de Pinto e colaboradores (2012) não identificaram a proteína *MraZ*, em nenhum dos estresses realizados na linhagem Cp1002. Mas, no presente trabalho, *mraZ* foi transcrita em todas as condições de estresse expostas, na linhagem Cp258. Como esta proteína é bastante conservada nas bactérias, o real motivo que ela não foi expressa em Cp1002 é desconhecido e deverá ser estudado futuramente.

O fato do gene *mraZ* ter sido transcrito apenas nas condições de estresse, em Cp258, somado aos dados obtidos na literatura é um indicativo que o gene é um ótimo candidato para estudos aprofundados *in vitro* e *in vivo*, e pode ser um possível alvo vacinal e para kits diagnósticos.

## **6.2.2. Processo de “óxido redução”**

Nas reações de óxido redução ocorre transferência de elétrons entre os compostos, um processo em que uma das substâncias perde elétrons (oxidada) e age como redutora, e a outra ganha elétrons (reduzida), sendo considerada um agente oxidante. A oxidação de uma molécula orgânica corresponde, normalmente, a diminuição de hidrogênio e aumento de oxigênio, e a redução ao aumento de hidrogênio e à diminuição de oxigênio.

Neste tópico, os transcritos de *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, correspondentes aos estresses e condição fisiológica, serão subdivididos pela relação entre as proteínas, ou seja, funções semelhantes e PPI.

### **6.2.2.1. Catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, tiol peroxidase e proteína comigratoria com bacterioferritina**

Catalase (Cp258\_0185), glutathiona peroxidase (Cp258\_1314; Cp258\_1747), superóxido dismutase (Cp258\_0614), tiol peroxidase (Cp258\_1182) e a proteína comigratoria com bacterioferritina (Bcp) (Cp258\_1650) apresentam atividades antioxidantes, por participarem da aniquilação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (RHO et al., 2006; WENNERHOLD et al., 2005; YESILKAYA et al., 2000). A detoxificação das ROS é de suma importância para a sobrevivência das células, e além das enzimas antioxidantes, outras vias também são utilizadas para a detoxificação, como as envolvidas no sequestro de ferro, as enzimas de reparo, sideróforos e proteínas de ligação ao DNA (HEO et al., 2010). As espécies reativas de oxigênio são geradas a partir da redução incompleta no processo de respiração celular; pela exposição à radiação e a componentes redox ativos; e durante o processo de fagocitose (YESILKAYA et al., 2000).

A catalase é a principal peroxidase de muitas bactérias, ou seja, decompõe peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. E por isso, juntamente com a glutathiona peroxidase, também faz parte do processo de “resposta ao estresse oxidativo”. A enzima catalase apresenta expressão constitutiva, em condições fisiológicas (HEO et al., 2010), e é induzida em todas as fases de

crescimento, mas em maior quantidade na fase estacionária (SHIN et al., 2008). Em estudos envolvendo mutações no gene que codifica a catalase, pesquisadores perceberam apenas uma pequena diminuição da viabilidade celular, e concluíram que glutathione peroxidase assume a função (BOWLER et al., 1992; HEO et al., 2010; LEE et al., 2005; YESILKAYA et al., 2000). Os pesquisadores também concluíram que na ausência das duas enzimas, somados a deficiência da superóxido dismutase, o microrganismo entra em senescência, confirmando a importância das mesmas. Heo e colaboradores (2010) analisaram o papel da catalase in vivo, utilizando dois modelos animais (drosófila e camundongo), e a identificaram como um fator de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando que a síntese da enzima é indispensável para a sobrevivência do patógeno nos fagócitos. Lee e colaboradores (2005) e Shin e colaboradores (2007), também estudando a função da catalase em *P. aeruginosa*, identificaram o papel crucial da mesma na resposta ao estresse oxidativo, assim como na adaptação e virulência. O segundo grupo de pesquisadores, além de analisarem a resposta ao estresse oxidativo, também verificaram a reação da bactéria ao estresse osmótico e concluíram que a enzima também influencia na resistência do patógeno nestas condições, sendo considerado por eles e por Heo e colaboradores (2010) um osmoprotetor.

A enzima superóxido dismutase (SOD) age em conjunto com a catalase e com a glutathione peroxidase, mas diferentemente das outras duas, a SOD realiza a dismutação (oxidação e redução do mesmo elemento) do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. SOD é considerada um fator de virulência nas bactérias, e sua mutação reduz a habilidade do microrganismo em invadir e permanecer no hospedeiro (BOWLER et al., 1992; YESILKAYA et al., 2000).

Na ausência do gene codificador da enzima SOD, ocorre um aumento na quantidade de superóxido, e este acúmulo destrói diferentes enzimas na ligação ferro-enxofre (Fe-S) (FLINT et al., 1993). Como consequência dessas ações, as quantidades de ferro intracelular livre também aumentam, e pela reação de Fenton ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} [OH^*] + OH^-$ ) ocorre a produção de radicais livres ( $OH^*$ ). Estes são danosos as células e podem gerar danos ao

DNA (quebras duplas) e levar a oxidação de lipídeos insaturados (MENEZHINI, 1997; WANG et al., 2006).

A tiol peroxidase (Tpx) também atua na detoxificação em bactérias. Esta enzima é responsável por defender o microrganismo contra, principalmente, hidroperóxidos orgânicos (ROOH) (KIM et al., 2006; RHO et al., 2006). A ligação entre os dois oxigênios (O-O) é rompida facilmente, e quando isso ocorre forma-se as ROS. Segundo Kim e colaboradores (2006) a expressão desta enzima se eleva no início da fase exponencial de crescimento, e pode ser considerada uma proteína *housekeeping* antioxidante. Os autores também identificaram que ela está localizada na membrana celular, ou seja, no primeiro ponto de contato com o hospedeiro.

Em *M. tuberculosis*, Tpx é um antígeno reconhecido durante o processo infeccioso, sendo um dos responsáveis por induzir a resposta proliferativa no hospedeiro (RHO et al., 2006). Os autores também observaram que a enzima protege o microrganismo também contra o estresse nitrosativo, além do oxidativo. A deleção do gene em *E. coli*, ocasionou perda da viabilidade da bactéria, e sugeriu que Tpx é importante na manutenção e estabilidade do biofilme (KIM et al., 2006). Todos os resultados obtidos por Rho e colaboradores (2006) e Kim e colaboradores (2006) indicam a tiol peroxidase com um fator de virulência importante nas bactérias.

Bcp também pertence à mesma família da Tpx, sendo considerada uma peroxidase dependente de tiol. E assim como Tpx apresenta preferência a peróxidos orgânicos, como o ácido linoleico hidroperóxido (COMTOIS et al., 2003). Segundo os autores, a deleção do gene *bcp*, em *H. pylori*, não afetou significativamente o crescimento bacteriano, em ambiente oxidativo, mas o mesmo não foi observado em *E. coli*. Esta apresentou uma hipersensibilidade ao peróxido de hidrogênio e a peróxidos orgânicos, quando o gene estava mutado (JEONG et al., 2000).

Para melhor compreender a ação dessa enzima, outros estudos foram realizados em *H. pylori* (WANG et al., 2005, 2006). Estes autores demonstraram que mutantes *bcp* apresentavam sensibilidade a superóxidos e hidroperóxidos orgânicos, como os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), mas não a hidróxido de hidrogênio. Os autores também observaram um aumento da quantidade de

ferro intracelular livre, consequência também notada na deleção do gene codificador de SOD.

A oxidação de lipídios (LOOH), altera as propriedades físicas, estruturais e organizacionais da membrana celular, contribuindo para o dano celular, e segundo Wang e colaboradores (2006), Bcp apresenta um papel chave na prevenção deste fenômeno *in vivo*.

Como mencionado, muitas das atividades das enzimas supracitadas se sobrepõem, sendo uma forma da célula garantir a eliminação das ROS e do peróxido de hidrogênio, entre outros compostos oxidativos e radicais livres (WANG et al., 2005). Houve uma variação nos transcritos dessas enzimas nas diferentes condições ambientais expostas a *C. pseudotuberculosis*, o que indica que apesar delas apresentarem funções sobrepostas, a ação de algumas ocorre em diferentes condições ambientais, ou mesmo em diferentes fases de crescimento. Isto foi observado por Wang e colaboradores (2005) para Bcp e outra enzima de função semelhante, alkyl hidroperóxido redutase (Ahp) (Cp258\_1238; Cp258\_1239). Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com os autores, que sugeriram que Ahp age somente na condição fisiológica de cultivo, enquanto Bcp atua na condição de estresse oxidativo e nitrosativo, representada neste trabalho pela condição ácida, uma vez que a geração de ROS é uma das consequências deste estresse.

Pinto e colaboradores (2012) também observaram a presença da catalase, Bcp e glutathione peroxidase nas condições de estresse, e pelos dados obtidos, não houve diferença aparente entre as enzimas, ou seja, todas elas estão presentes em todas as situações adversas aplicadas. Mais estudos são necessários para melhor compreender a dinâmica dessas importantes enzimas antioxidantes, mas é possível afirmar que as funções realizadas pelas enzimas são indispensáveis para a sobrevivência do patógeno durante a infecção.

#### **6.2.2.2. Tiorredoxina e tiorredoxina redutase**

Tiorredoxina (Trx) (Cp258\_2044; Cp258\_2126) e tiorredoxina redutase (TrxR) (Cp258\_2125) pertencem ao sistema tiol redox, assim como a glutathione



peroxidase. Tióis estão presentes em grupos funcionais de aminoácidos (cisteína) e em cofatores, sendo um dos alvos mais sensíveis a danos oxidativos nas proteínas (LEICHERT et al., 2008). E os sistemas redox tiol específicos protegem as células contra ROS, estão relacionados a manutenção das ligações dissulfeto (dois grupos tiol) e fornecimento de energia para enzimas redox (ARNÉR e HOLMGREN, 2000; UZIEL et al., 2004). Para isso, Trx é mantida reduzida pela enzima TrxR, ou pela enzima glutarredoxina, que é ausente em muitas bactérias Gram positivas (NEWTON et al., 1993; UZIEL et al., 2004).

Em estudos utilizando *E. coli* como modelo, a deleção de *trxR* não ocasionou mudanças significativas no crescimento, mas quando o mesmo foi realizado em *Staphylococcus aureus*, nenhum mutante foi obtido, o que indica o papel essencial dessa enzima para a sobrevivência, durante estresse oxidativo (UZIEL et al., 2004; WIELES et al., 1995). Segundo os autores, nesta condição adversa a transcrição do gene aumentou, quando comparada a condição fisiológica, e sua ausência prejudicou a síntese de DNA e a homeostase celular.

Em *Helicobacter pylori* dois genes *trx* foram identificados, e apresentavam a estresses (COMTOIS et al., 2003). Neste trabalho, dois genes também foram identificados. O Cp258\_2126 codifica a tiorredoxina, enquanto o Cp258\_2044, a tiorredoxina *trxA*. Estudos são necessários para identificar se estes genes apresentam funções sobrepostas ou distintas, mas uma possível diferença em relação aos estresses foi identificada. A primeira foi transcrita na condição ácida, enquanto a segunda na condição térmica, e ambas estão presentes na condição fisiológica. Isto indica uma possível diferença na tolerância e função, em diferentes condições celulares.

A tiorredoxina redutase foi transcrita apenas nas duas condições de estresse (ácida e térmica). Estes resultados sugerem a importância da enzima em situações adversas e confirma os resultados obtidos por Wieles e colaboradores (1995), que a TrxR é estável em altas temperaturas. Os resultados de Pinto e colaboradores (2011) também corroboram com estes resultados, uma vez que Trx está presente em todas as condições estresse, e uma tiorredoxina-dissulfeto redutase também foi transcrita apenas na condição ácida.

O conjunto Trx e TrxR provavelmente apresenta extrema importância na sobrevivência bacteriana, nas condições que simulam uma infecção, além de influenciarem a ação de outras enzimas, como Bcp e Tpx. Estas utilizam a tiorredoxina como fonte de elétrons (WANG et al., 2005). Por todos os motivos citados, elas podem ser alvos interessantes para outros estudos envolvendo *C. pseudotuberculosis*.

### **6.2.2.3. Proteína semelhante a ferritina e proteína de proteção ao DNA durante inanição**

Ferro é um composto essencial para os seres vivos, mas como mencionado, na forma livre intracelular ele é prejudicial, devido a formação de íons hidroxila (MENEHINI, 1997). O sistema de sequestro deste componente varia entre as bactérias, assim como o papel na proteção contra o estresse oxidativo, mas todos eles contribuem na proteção do microrganismo contra alterações na concentração de ferro intracelular (RATNAYAKE et al., 2000).

Uma proteína semelhante a ferritina (Cp258\_1687) foi transcrita em *C. pseudotuberculosis* 258 na condição de estresse térmico. Ferritinas são macromoléculas responsáveis pelo armazenamento de ferro nas células eucariotas. Em procariotos, existem diferentes mecanismos que exercem esta função, como os sideróforos, compostos orgânicos com alta afinidade ao ferro, responsáveis pela captação de ferro, tanto do ambiente externo como diretamente do hospedeiro (RATNAYAKE et al., 2000). Cp258\_1687 possivelmente apresenta um papel importante na manutenção da viabilidade celular, em altas temperaturas.

Como mencionado, durante o estresse, proteínas necessárias para a sobrevivência, aumentam sua expressão, e muitas delas necessitam de ferro para cumprirem suas funções (LITWIN e CALDERWOOD, 1993). Entre essas, destacam-se as peroxidases, desidrogenases e redutases, entre outras envolvidas em transporte de elétrons. Desta forma, a ação de compostos que sequestram ferro do meio é de extrema importância para a sobrevivência do microrganismo, além de serem relacionados com a virulência das bactérias.

Outra proteína identificada neste estudo foi a Dps (proteína de proteção ao DNA durante inanição) (Cp258\_2066), sendo transcrita nas condições ácida, térmica e fisiológica. Dps é uma proteína semelhante as ferritinas, que protege o DNA contra danos, por sua capacidade de se ligar ao ferro (HALSEY et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2002). Esta proteína oferece resistência contra estresse oxidativo, em algumas bactérias, sendo induzida após a entrada no macrófago, influenciando na sobrevivência do microrganismo durante processos infecciosos, (ERIKSSON et al., 2003; HALSEY et al., 2004; RATNAYAKE et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002).

Halsey e colaboradores (2004) demonstraram que os mutantes (*dps*) de *Salmonella enterica* apresentavam deficiência em sobreviver nos macrófagos, e eram rapidamente eliminados pelo hospedeiro. Estes resultados sugerem que Dps é importante na virulência e habilidade de persistir no hospedeiro, o que pode estar relacionado com a capacidade de inibir a produção de ROS, sendo um potente antioxidante.

Na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, a proteína Dps foi transcrita em todas as condições de estresse impostas, e a ferritina na osmótica e ácida (PINTO et al., 2012). Mais estudos são necessários para entender a regulação desses genes relacionados a aquisição de ferro. De acordo com os resultados, os genes provavelmente possuem papéis essenciais para a sobrevivência e patogenicidade das bactérias, no hospedeiro, o que está de acordo com Pinto e colaboradores (2012).

#### **6.2.2.4. Biossíntese da parede celular**

A parede celular lipídica do grupo CMNR é alvo de diversas pesquisas, uma vez que é um conhecido fator de virulência. Constantemente novas drogas e terapias são lançadas no mercado, isso devido ao aparecimento de linhagens resistentes a multidrogas (FITZMAURICE e KOLATTUKUDY, 1998). Apesar dos genes envolvidos na síntese de peptidoglicano serem reprimidos em resposta ao estresse térmico, a expressão ainda é necessária para a manutenção da fluidez da parede. Neste tópico será abordado os genes

descritos dentro do processo “óxido redução”, que estão envolvidos na síntese da parede celular.

#### **6.2.2.4.1. Decaprenilfosforil-D-2-keto eritropentose redutase e Decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase**

Decaprenilfosforil-D-2-keto eritropentose redutase (DprE2) (Cp258\_0115) e decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase (DprE1) (Cp258\_0116) são enzimas envolvidas na síntese de arabinose, açúcar constituinte do peptidoglicano (MAKAROV et al., 2009; UMESIRI et al., 2010). Elas catalisam a reação de decaprenilfosforil ribose (DRP) para decaprenilfosforil arabinose (DPA).

Na ausência dessas enzimas não ocorre a formação completa da parede celular de *M. tuberculosis*, que é indispensável na proteção do microrganismo durante a infecção, sendo considerado um potente fator de virulência (MAKAROV et al., 2009; UMESIRI et al., 2010). Arabinogalactose (arabinose + galactose) age como ligante, conectando o peptidoglicano (parte interna) com os ácidos micólicos (superfície), função crítica para a virulência (MAKAROV et al., 2009).

Muitas drogas utilizadas no combate da tuberculose, doença causada pela *M. tuberculosis*, apresenta como alvo algum componente da parede celular. E uma dessas é o BTZ (1,3-benzothiazin-4-ones), que possui como alvo o DprE1 (MAKAROV et al., 2009). O tratamento contra esta bactéria é longo e requer a ação de diferentes antibióticos, e um dos motivos é a baixa permeabilidade da parede, dita como essencial e seletiva, protegendo a maquinaria celular contra as drogas, mas ao mesmo tempo sendo um potencial alvo (FAVROT e RONNING, 2012; MAKAROV et al., 2009; UMESIRI et al., 2010).

Assim como *M. tuberculosis*, *C. pseudotuberculosis* apresenta essa parede celular especializada, e estudos visando o bloqueio da ação de uma dessas enzimas críticas na síntese de arabinose pode ser promissor. *dprE1* foi transcrito na condição fisiológica de cultivo e no estresse ácido, enquanto DprE2 está presente na condição fisiológica de cultivo e no estresse ácido e

térmico. Mais estudos são necessários para melhor compreender a ação de DprE1 e DprE2 em *C. pseudotuberculosis*.

## 7. CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo envolvendo o transcriptoma do biovar *equi* de *C. pseudotuberculosis*, em condições de estresse ácido, térmico, e osmótico. E através dele foi possível caracterizar os genes envolvidos na divisão e ciclo celular, e na cadeia de eventos da síntese e transporte da glicina betaína, um potente osmoprotetor. Além de identificar genes relacionados a proteção ao estresse térmico e ácido, e principalmente os atrelados ao processo de “óxido redução”, como desidrogenases, peroxidases, e genes envolvidos na aquisição de ferro e biossíntese de componentes da parede celular. Este processo foi o mais representado, de forma que o presente trabalho descreveu diferentes genes envolvidos na proteção contra ROS, aquisição de ferro, e síntese de compostos da parede celular.

De acordo com dados de susceptibilidade, houve uma redução da replicação bacteriana, após a aplicação dos estresses. E os resultados do transcriptoma de *C. pseudotuberculosis* 258 apontaram o *stimulon* ácido como o mais representado, entre os estresses. Este descreve diferentes transcritos envolvidos na “resposta ao estresse oxidativo” e “resposta ao choque térmico”, entre outros genes presentes no processo de “óxido redução”, relacionados a sobrevivência e patogenicidade da bactéria. O *stimulon* térmico também foi representado pelo processo de “resposta ao choque térmico”, e assim como o ácido, genes do processo de “óxido redução” importantes para o patógeno também foram transcritos. O *stimulon* osmótico obteve poucos transcritos e outros estudos serão necessários para compreender a dinâmica desta condição em *C. pseudotuberculosis* linhagem 258, mas alguns genes interessantes foram transcritos, como *MraZ* e *FolD*.

Através dos dados obtidos nesse trabalho foi possível sugerir possíveis genes importantes na sobrevivência e virulência do patógeno, em condições que simulam a infecção no hospedeiro. Entre eles se destaca a proteína de divisão celular *MraZ* (descrita nas três condições de estresse); o conjunto *Trx* (descrita nas condições fisiológica, ácida e térmica) e *TrxR* (descrita nas condições ácida e térmica), de proteção contra ROS; a proteína *Dps* (descrita nas condições fisiológica, ácida e térmica) e a proteína semelhante a ferritina (descrita no estresse térmico), ambas relacionadas a aquisição de ferro; e as

enzimas DrpE1 (descrita nas condições fisiológica, ácida e térmica) e DrpE2 (descrita nas condições ácida e fisiológica) de síntese de componentes da parede.

## 8. PERSPECTIVAS

No intuito de enriquecer os resultados obtidos e melhor compreender os genes expressos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 258, nas condições de estresse, novos estudos serão realizados, como:

- Realizar um estudo de expressão diferencial de *C. pseudotuberculosis* 258, na plataforma de segunda geração SOLiD™ V3 (em andamento);
- Confirmar os genes selecionados neste trabalho e no de expressão diferencial através de PCR em tempo real;
- Comparar os resultados de expressão diferencial obtidos das linhagens 258 e 1002 de *C. pseudotuberculosis*. A partir deste estudo torna-se possível comparar os dois biovares da espécie, e desta forma dirigir a escolha de genes candidatos a vacinas e kits diagnóstico que sejam compartilhados entre os biovares, e assim fabricar um método universal que proteja um maior número de espécies.



## 9. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. W.; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 642–653, set. 2009.
- ADAMS, M. A. et al. MraZ from *Escherichia coli*: cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. 4, p. 378–380, 1 abr. 2005.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 34, n. 7, p. 1313–1318, 1999.
- ANDERSEN, M. T. et al. Diverse roles for HspR in *Campylobacter jejuni* revealed by the proteome, transcriptome and phenotypic characterization of an hspR mutant. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 905–915, 1 mar. 2005.
- ANTUNES, J. M. A. DE P.; MEGID, J. *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, 24 jun. 2013.
- ARENDS, S. J. R.; KUSTUSCH, R. J.; WEISS, D. S. ATP-Binding Site Lesions in FtsE Impair Cell Division. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 3772–3784, 15 jun. 2009.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, 1 out. 2000.
- ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi–visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive veterinary medicine**, v. 59, n. 1, p. 67–81, 2003.
- ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 435–442, abr. 2000.
- AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. **Corynebacterium pseudotuberculosis survival in soil samples amended with water** Proceedings of the Third International Conference on Goat Production and Diseases. **Anais...**1982
- AZAD, A. K. et al. Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 4787–4792, 14 maio 1996.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007.
- BARREIRO, C. et al. Heat Shock Proteome Analysis of Wild-Type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a Spontaneous Mutant Lacking GroEL1, a Dispensable Chaperone. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 884–889, 1 fev. 2005.

BARREIRO, C. et al. Microarray studies reveal a “differential response” to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 359–372, 1 fev. 2009.

BERNARD, K. < i> *Corynebacterium*</i> species and coryneforms: An update on taxonomy and diseases attributed to these taxa. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 2, p. 9–18, 2005.

BERNARD, K. The Genus *Corynebacterium* and Other Medically-Relevant, Coryneform like Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, p. JCM.00796–12, 25 jul. 2012.

BERNHEIMER, A. W.; CAMPBELL, B. J.; FORRESTER, L. J. Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Science**, v. 228, n. 4699, p. 590–591, 1985.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691–692, 1971.

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41–45, 1 fev. 2002.

BOCH, J. et al. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the gbsAB genes. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5121–5129, 1996.

BOCH, J. et al. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. **Archives of Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 282–289, 1 set. 1997.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. VAN; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 83–116, 1992.

BRAITHWAITE, C. E. et al. Characterization of detergent-soluble proteins of< i> *Corynebacterium pseudotuberculosis*</i>. **Veterinary microbiology**, v. 38, n. 1, p. 59–70, 1993.

BUKAU, B. et al. Getting Newly Synthesized Proteins into Shape. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 119–122, 14 abr. 2000.

BUXTON, A.; FRASER, G.; OTHERS. **Animal microbiology. Volume 1: immunology, bacteriology, mycology, diseases of fish and laboratory methods**. [s.l.] Blackwell Scientific Publications., 1977.

CA, M.; CL, G. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **American journal of veterinary research**, v. 44, n. 6, p. 1149–1153, jun. 1983.

CARNE, H. R.; WICKHAM, N.; KATER, J. C. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. 1956.

CARSON, S. D. B. et al. Ferric Enterobactin Binding and Utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2895–2901, 1999.

CARVALHO, M. C. DA C. G. DE; SILVA, D. C. G. DA. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, mar. 2010.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. A Survey of the Structures of Mycolic Acids in *Corynebacterium* and Related Taxa. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 129–149, 1 jan. 1982a.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. Fatty Acid Composition of Some Mycolic Acid-containing Coryneform Bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 11, p. 2503–2509, 1 nov. 1982b.

COMTOIS, S. L.; GIDLEY, M. D.; KELLY, D. J. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 121–129, 1 jan. 2003.

CORBIN, B. D. et al. Interaction between Cell Division Proteins FtsE and FtsZ. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3026–3035, 15 abr. 2007.

COSTA, M. S. DA; SANTOS, H.; GALINSKI, E. A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In: ANTRANIKIAN, G. (Ed.). **Biotechnology of Extremophiles**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 117–153.

CRUVINEL, W. DE M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

D'ARI, L.; RABINOWITZ, J. C. Purification, characterization, cloning, and amino acid sequence of the bifunctional enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 23953–23958, 15 dez. 1991.

DAI, K.; LUTKENHAUS, J. The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 19, p. 6145–6151, 1 out. 1992.

DELFORGE, D. et al. Similarities between Alanine Dehydrogenase and the N-Terminal Part of Pyridine Nucleotide Transhydrogenase and Their Possible Implication in the Virulence Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 190, n. 3, p. 1073–1079, 15 fev. 1993.

DEMAND, J.; LÜDERS, J.; HÖHFELD, J. The Carboxy-Terminal Domain of Hsc70 Provides Binding Sites for a Distinct Set of Chaperone Cofactors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 4, p. 2023–2028, 1 abr. 1998.

DEUERLING, E. et al. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. **Nature**, v. 400, n. 6745, p. 693–696, 12 ago. 1999.

DEUTSCHER, M. P. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 659–666, 1 jan. 2006.

DOHERR, M. G. et al. Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses. **Preventive veterinary medicine**, v. 35, n. 4, p. 229–239, 30 jun. 1998.

- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, mar. 2006a.
- DORELLA, F. A. et al. In Vivo Insertional Mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an Efficient Means To Identify DNA Sequences Encoding Exported Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7368–7372, 1 nov. 2006b.
- DORELLA, F. A. et al. Progression of “OMICS” methodologies for understanding the pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the Brazilian experience. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 6, n. 0, 13 out. 2013.
- DORNELES, E. M. et al. Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98758, 2014.
- EHIRA, S. et al. Regulation of *Corynebacterium glutamicum* Heat Shock Response by the Extracytoplasmic-Function Sigma Factor SigH and Transcriptional Regulators HspR and HrcA. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 9, p. 2964–2972, 1 maio 2009.
- ERASO, J. M. et al. The Highly Conserved MraZ Protein Is a Transcriptional Regulator in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 11, p. 2053–2066, 1 jun. 2014.
- ERIKSSON, S. et al. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 1, p. 103–118, 2003.
- ESHOO, M. W. lac fusion analysis of the bet genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 11, p. 5208–5215, 1988.
- EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; KLUG, G. New aspects of RNA processing in prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials/Genomics. v. 14, n. 5, p. 587–592, out. 2011.
- FAVROT, L.; RONNING, D. R. Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. 2012.
- FITZMAURICE, A. M.; KOLATTUKUDY, P. E. An Acyl-CoA Synthase (acoas) Gene Adjacent to the Mycocerosic Acid Synthase (mas) Locus Is Necessary for Mycocerosyl Lipid Synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. bovis BCG. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8033–8039, 3 abr. 1998.
- FLINT, D. H.; TUMINELLO, J. F.; EMPTAGE, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22369–22376, 1993.
- FOLEY, J. E. et al. Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. **American journal of veterinary research**, v. 65, n. 12, p. 1734–1737, 2004.
- FOLLMANN, M. et al. Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 621, 21 dez. 2009.

- FRÄNZEL, B. et al. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 3, p. 445–457, 1 fev. 2010.
- GILL, D. R.; SALMOND, G. P. C. The *Escherichia coli* cell division proteins FtsY, FtsE and FtsX are inner membrane-associated. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 210, n. 3, p. 504–508, 1 dez. 1987.
- GOPHNA, U.; RON, E. Z. Virulence and the heat shock response. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 292, n. 7-8, p. 453–461, fev. 2003.
- GRAINGE, I.; LESTERLIN, C.; SHERRATT, D. J. Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p. 5140–5148, 1 jul. 2011.
- GÜELL, M. et al. Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA horizo-me? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 658–669, set. 2011.
- GUIMARÃES, A. DE S. et al. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR. **Veterinary microbiology**, v. 153, n. 3, p. 299–306, 2011.
- HÄGERHÄLL, C. Succinate: quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1320, n. 2, p. 107–141, 1997.
- HALL, K.; MCCLUSKEY, B. J.; CUNNINGHAM, W. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections (Pigeon Fever) in horses in Western Colorado: An epidemiological investigation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 6, p. 284–286, jun. 2001.
- HALSEY, T. A. et al. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1155–1158, 2004.
- HAMOEN, L. W. et al. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 989–999, 1 fev. 2006.
- HAN, Y. et al. DNA microarray analysis of the heat- and cold-shock stimulons in *Yersinia pestis*. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 3, p. 335–348, mar. 2005.
- HEO, Y.-J. et al. The Major Catalase Gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Is under both Positive and Negative Control of the Global Transactivator OxyR in Response to Hydrogen Peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 381–390, 15 jan. 2010.
- HETT, E. C.; RUBIN, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 1, p. 126–156, 1 mar. 2008.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; DE SOUZA COUTINHO, A. **Microbiologia veterinária**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2003.
- HONRUBIA, M.; RAMOS, A.; GIL, J. The cell division genes *ftsQ* and *ftsZ*, but not the three downstream open reading frames YFIH, ORF5 and ORF6, are essential for growth and viability in *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, n. 6, p. 1022–1030, 2001.

- HUTTER, B.; SINGH, M. Host vector system for high-level expression and purification of recombinant, enzymatically active alanine dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene**, v. 212, n. 1, p. 21–29, 28 maio 1998.
- IKEDA, M. et al. Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 11, p. 6375–6378, 1 nov. 1989.
- IWATA, S. et al. T and R states in the crystals of bacterial L-lactate dehydrogenase reveal the mechanism for allosteric control. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 1, n. 3, p. 176–185, mar. 1994.
- JAKOB, K. et al. Gene Expression Analysis of *Corynebacterium glutamicum* Subjected to Long-Term Lactic Acid Adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 15, p. 5582–5590, 1 ago. 2007.
- JEONG, W.; CHA, M.-K.; KIM, I.-H. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2924–2930, 2000.
- JIN, Y. et al. Tracking bacterial infection of macrophages using a novel red-emission pH sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 1375–1384, out. 2010.
- JJ, T.; SG, C. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. **American journal of veterinary research**, v. 44, n. 4, p. 690–693, abr. 1983.
- JOLLY, R. D. Some Observations on Surface Lipids of Virulent and Attenuated Strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n. 1, p. 189–196, 1 abr. 1966.
- KALINOWSKI, J. et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. **Journal of Biotechnology, A New Era in Corynebacterium Glutamicum Biotechnology**, v. 104, n. 1–3, p. 5–25, 4 set. 2003.
- KARIMOVA, G.; DAUTIN, N.; LADANT, D. Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2233–2243, 1 abr. 2005.
- KIJIMA, N. et al. Induction of only limited elongation instead of filamentation by inhibition of cell division in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 227–232, 1 ago. 1998.
- KIM, Y. H. et al. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 23, p. 6181–6193, 1 dez. 2006.
- KOBOLDT, D. C. et al. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 27–38, 26 set. 2013.
- KREMER, L.; BAULARD, A. R.; BESRA, G. S. Genetics of mycolic acid biosynthesis. **Molecular genetics of Mycobacteria**, p. 173–190, 2000.

- KURIA, J. K. et al. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. **Veterinary research communications**, v. 25, n. 2, p. 89–97, fev. 2001.
- LEE, J.-S. et al. KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4399–4403, 1 jul. 2005.
- LEE, Y. H.; HELMANN, J. D. Reducing the Level of Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase Has Complex Effects on Susceptibility to Cell Wall Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4267–4275, 1 set. 2013.
- LEICHERT, L. I. et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8197–8202, 2008.
- LETEK, M. et al. Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 1, p. 99–109, jun. 2008.
- LEUCHTENBERGER, W. Amino acids—technical production and use. **Biotechnology: Products of Primary Metabolism, Volume 6, Second Edition**, p. 465–502, 1996.
- LITWIN, C. M.; CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 137–149, 1993.
- LIU, J. et al. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29545–29551, 22 nov. 1996.
- MAGI, A. et al. Bioinformatics for Next Generation Sequencing Data. **Genes**, v. 1, n. 2, p. 294–307, 14 set. 2010.
- MAGNUSON, K. et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 522–542, 1 set. 1993.
- MAKAROV, V. et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 801–804, 2009.
- MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in genetics: TIG**, v. 24, n. 3, p. 133–141, mar. 2008.
- MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671–682, 7 set. 2011.
- MBANDI, S. K. et al. A glance at quality score: implication for de novo transcriptome reconstruction of Illumina reads. **Bioinformatics and Computational Biology**, v. 5, p. 17, 2014.
- MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees C. **Research in microbiology**, v. 158, n. 3, p. 279–286, abr. 2007.
- MENEHINI, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 5, p. 783–792, 1997.

MERCER, K. L. N.; WEISS, D. S. The Escherichia coli Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 904–912, 15 fev. 2002.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **The genus corynebacterium**. [s.l.] Veterinary Bacteriology and Virology. USA: The Iowa State University Press, 1967.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, jan. 2010.

MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, n. 6, p. 315–327, 2010.

MOGK, A. et al. Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 24, p. 6934–6949, 15 dez. 1999.

MOTOHASHI, K. et al. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK·J·GrpE set and ClpB chaperones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7184–7189, 22 jun. 1999.

MUFFLER, A. et al. Genome-wide transcription profiling of Corynebacterium glutamicum after heat shock and during growth on acetate and glucose. **Journal of Biotechnology**, Highlights from ECB10 - Applied Genome Research. v. 98, n. 2–3, p. 255–268, 25 set. 2002.

NANTAPONG, N. et al. Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in Corynebacterium glutamicum KY9714. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 187–193, 2004.

NARBERHAUS, F. Negative regulation of bacterial heat shock genes. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 1, p. 1–8, jan. 1999.

NEWTON, G. L. et al. Low-molecular-weight thiols in streptomycetes and their potential role as antioxidants. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2734–2742, 1993.

NISHIHARA, K. et al. Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 884–889, 1 mar. 2000.

OHASHIMA, T.; SODA, K. Purification and properties of alanine dehydrogenase from Bacillus sphaericus. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 100, n. 1, p. 29–30, out. 1979.

PAGANI, I. et al. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D571–D579, jan. 2012.

PASSALACQUA, K. D. et al. Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3203–3211, 15 maio 2009.

PINTO, A. C. et al. The core stimulon of Corynebacterium pseudotuberculosis strain 1002 identified using ab initio methodologies. **Integrative Biology**, v. 4, n. 7, p. 789, 2012.



- PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 11, p. 1765–1768, 1998.
- POCARD, J.-A. et al. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. **Microbiology**, v. 143, n. 4, p. 1369–1379, 1 abr. 1997.
- POP, M.; SALZBERG, S. L.; SHUMWAY, M. Genome sequence assembly: Algorithms and issues. **Computer**, v. 35, n. 7, p. 47–54, 2002.
- PORTEVIN, D. et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 314–319, 6 jan. 2004.
- PRACHI, P. et al. Deep Sequencing in Pre- and Clinical Vaccine Research. **Public Health Genomics**, v. 16, n. 1-2, p. 62–68, 2013.
- RAMOS, J. L. et al. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 2, p. 166–171, 2001.
- RATNAYAKE, D. B. et al. Ferritin from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*: purification, gene cloning and mutant studies. **Microbiology**, v. 146, n. 5, p. 1119–1127, 2000.
- RAYBOURNE, R. B.; BUNNING, V. K. Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p. 665–672, fev. 1994.
- RHO, B.-S. et al. Functional and Structural Characterization of a Thiol Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, n. 5, p. 850–863, set. 2006.
- RIBEIRO, D. et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, v. 45, p. 28, 2014.
- ROBERTSON, G. et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature Methods**, v. 7, n. 11, p. 909–912, nov. 2010.
- RODRÍGUEZ-MONTELONGO, L. et al. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 451, n. 1, p. 1–7, jul. 2006.
- RÖNSCH, H.; KRÄMER, R.; MORBACH, S. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. **Journal of Biotechnology**, v. 104, n. 1-3, p. 87–97, set. 2003.
- ROWLEY, D. L.; PEASE, A. J.; WOLF, R. E. Genetic and physical analyses of the growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* zwf expression. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 15, p. 4660–4667, 1991.
- RUIZ, J. C. et al. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18551, 18 abr. 2011.

SAAVEDRA, L.; SESMA, F. Atypical genetic locus associated with the zwf gene encoding the glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Enterococcus mundtii* CRL35. **Current microbiology**, v. 51, n. 3, p. 148–152, 2005.

SATORHELYI, P. Microarray-analyse der pH-stressantwort von *Listeria monocytogenes* und *Corynebacterium glutamicum*. **Technische Universität München, Munich, Germany**, 2005.

SHELL, M. A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 597–626, 1993.

SCHMIDT, K. L. et al. A Predicted ABC Transporter, FtsEX, Is Needed for Cell Division in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 785–793, 1 fev. 2004.

SCHRÖDER, H. et al. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. **The EMBO journal**, v. 12, n. 11, p. 4137–4144, nov. 1993.

SCHULZ, M. H. et al. Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, p. bts094, 24 fev. 2012.

SCHUMANN, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. **Journal of biosciences**, v. 32, n. 3, p. 549–557, 2007.

SELETZKY, J. M. et al. Metabolic activity of *Corynebacterium glutamicum* grown on l-lactic acid under stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1297–1307, 1 out. 2006.

SELIM, S. A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 48, n. 4, p. 241–258, maio 2001.

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**, v. 88, n. 1, p. 50–55, fev. 2010.

SHERRATT, D. J. et al. The *Escherichia coli* DNA translocase FtsK. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 2, p. 395, 1 abr. 2010.

SHIMADA, K.; FUKUMAKI, Y.; TAKAGI, Y. Expression of the guanine operon of *Escherichia coli* as analyzed by bacteriophage lambda-induced mutations. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 147, n. 2, p. 203–208, 1976.

SHIN, D.-H.; CHOI, Y.-S.; CHO, Y.-H. Unusual Properties of Catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Are Associated with Its Biofilm Peroxide Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2663–2670, 15 abr. 2008.

SINGATHIA, R. et al. THERAPEUTIC MANAGEMENT OF ULCERATIVE LYMPHANGITIS IN A MARE. **Haryana Veterinarian**, v. 50, p. 103–104, 2011.

SKJERDAL, O. T. et al. Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1099–1106, 1995.

- SKJERDAL, O. T. et al. Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 5, p. 635–642, 1 jan. 1996.
- SOARES, S. C. et al. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 135–141, ago. 2013.
- SONGER, J. G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 2, p. 223–226, 1988.
- SPIER, S. J. et al. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **American journal of veterinary research**, v. 65, n. 6, p. 829–834, jun. 2004.
- SPIER, S. J. et al. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi in soil. **Veterinary Record**, v. 170, n. 7, p. 180–180, 18 fev. 2012.
- STANSEN, C. et al. Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5920–5928, 2005.
- STEWART, G. R. et al. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 732–737, jun. 2001.
- STEWART, G. R. et al. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 3129–3138, 1 out. 2002.
- STINGELE, F.; MOLLET, B. Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (pbp2b) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. **Molecular Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 357–366, 1 out. 1996.
- STYRVOLD, O. B. et al. Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. **Journal of bacteriology**, v. 165, n. 3, p. 856–863, 1986.
- T, E. C. et al. **[13C]propionate oxidation in wild-type and citrate synthase mutant *Escherichia coli*: evidence for multiple pathways of propionate utilization**. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/291/bj2910927.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2014.
- TASHJIAN, J. J.; CAMPBELL, S. G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. **American journal of veterinary research**, v. 44, n. 4, p. 690–693, 1983.
- TRAN, Q. M. et al. The Quinone Binding Site in *Escherichia coli* Succinate Dehydrogenase Is Required for Electron Transfer to the Heme b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 43, p. 32310–32317, 27 out. 2006.
- TROST, E. et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.

- UMESIRI, F. E. et al. Recent advances toward the inhibition of mAG and LAM synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 2, p. 290–326, 1 mar. 2010.
- USHA, V. et al. Identification of novel diphenyl urea inhibitors of Mt-GuaB2 active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 290–299, 1 jan. 2011.
- USHA, V. et al. Identification of Novel Mt-GuaB2 Inhibitor Series Active against *M. tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33886, 29 mar. 2012.
- UZIEL, O. et al. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 2, p. 326–334, 2004.
- VAN VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, n. 1, p. 1–7, jan. 2010.
- VARELA, C. et al. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 547–555, 1 jan. 2003.
- VARELA, C. A.; BAEZ, M. E.; AGOSIN, E. Osmotic Stress Response: Quantification of Cell Maintenance and Metabolic Fluxes in a Lysine-Overproducing Strain of *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4222–4229, 1 jul. 2004.
- VEIT, A.; POLEN, T.; WENDISCH, V. F. Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 406–421, 1 fev. 2007.
- VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.
- VICENTE, M.; ERRINGTON, J. Structure, function and controls in microbial division. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 1 abr. 1996.
- VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 641–658, 1 abr. 2009.
- WANG, G. et al. Contribution of the *Helicobacter pylori* Thiol Peroxidase Bacterioferritin Comigratory Protein to Oxidative Stress Resistance and Host Colonization. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 378–384, 1 jan. 2005.
- WANG, G. et al. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: Protective roles of peroxiredoxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1760, n. 11, p. 1596–1603, nov. 2006.
- WANG, L.; LUTKENHAUS, J. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 731–740, 1 ago. 1998.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WEIBEZAHN, J. et al. Thermotolerance Requires Refolding of Aggregated Proteins by Substrate Translocation through the Central Pore of ClpB. **Cell**, v. 119, n. 5, p. 653–665, 24 nov. 2004.

WENNERHOLD, J.; KRUG, A.; BOTT, M. The AraC-type Regulator RipA Represses Aconitase and Other Iron Proteins from *Corynebacterium* under Iron Limitation and Is Itself Repressed by DtxR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40500–40508, 9 dez. 2005.

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 618–630, 14 ago. 2012.

WHATMORE, A. M.; CHUDEK, J. A.; REED, R. H. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 12, p. 2527–2535, dez. 1990.

WHATMORE, A. M.; REED, R. H. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 12, p. 2521–2526, dez. 1990.

WIELES, B. et al. Unique gene organization of thioredoxin and thioredoxin reductase in *Mycobacterium leprae*. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 921–929, 1 jun. 1995.

WILHELM, B. T. et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, v. 453, n. 7199, p. 1239–1243, 26 jun. 2008.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359–71, 2001.

WILSON, M. J.; BRANDON, M. R.; WALKER, J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 1, p. 206–211, 1995.

YAMAMOTO, Y. et al. An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 11, p. 2931–2939, 2002.

YESILKAYA, H. et al. Role of Manganese-Containing Superoxide Dismutase in Oxidative Stress and Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2819–2826, 1 maio 2000.

ZAVOSHTI, F. R. et al. A case report of ulcerative lymphangitis (a mini review of causes and current therapies). **Turk. J. Vet. Anim. Sci**, v. 33, n. 6, p. 525–528, 2009.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 1 maio 2008.

ZHANG, W. et al. A Practical Comparison of De Novo Genome Assembly Software Tools for Next-Generation Sequencing Technologies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17915, 14 mar. 2011.

ZHAO, J. et al. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. **Metabolic engineering**, v. 6, n. 2, p. 164–174, 2004.

ZHOU, D.; YANG, R. Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 19-20, p. 2260–2290, 2006.

ZOLKIEWSKI, M. ClpB Cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in Suppressing Protein Aggregation A NOVEL MULTI-CHAPERONE SYSTEM FROM ESCHERICHIA COLI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28083–28086, 1 out. 1999.

.

## 10. ANEXOS

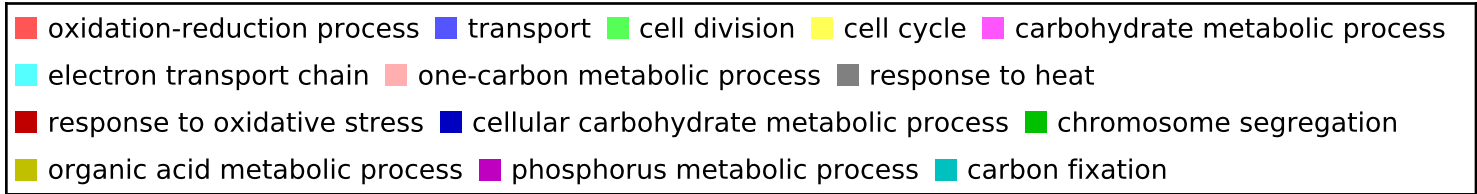
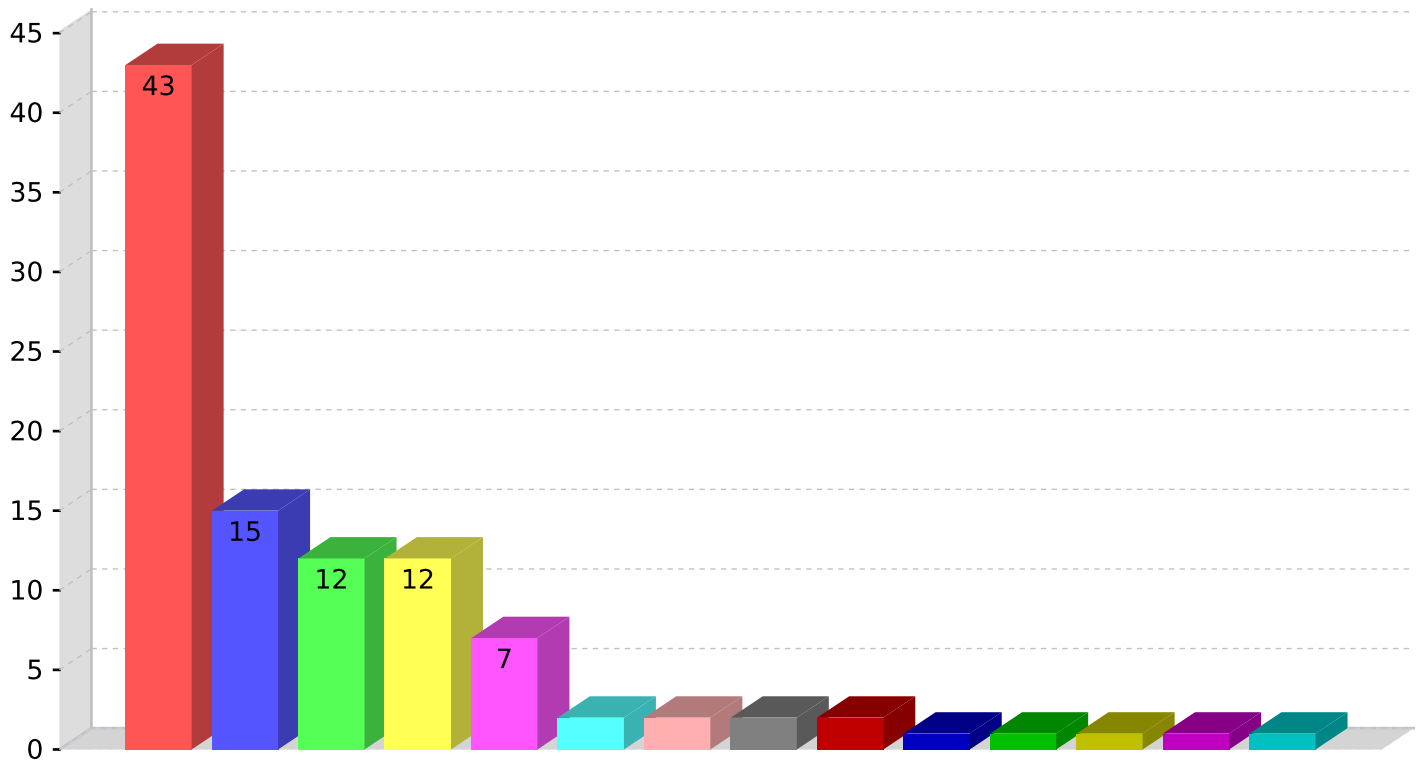
- 10.1. Anexo A - Lista dos transcritos do *stimulon* ácido (nível 4).
- 10.2. Anexo B - Lista dos transcritos do *stimulon* térmico (nível 4).
- 10.3. Anexo C - Lista dos transcritos do *stimulon* osmótico (nível 4).
- 10.4. Anexo D - Lista dos transcritos da condição fisiológica (nível 4).
- 10.5. Anexo E - Lista dos transcritos de todas as condições (nível 4).
- 10.6. Anexo F - Lista dos transcritos de todas as condições (nível 3).

## **ANEXO A**

### **Lista dos transcritos do estímulo ácido (nível 4)**



### GO by Process/ GO Level:4



#### carbohydrate metabolic process

CDS	Annotation
1 Cp258_0415	phosphoglucosamine mutase 416743:418086 forward
2 Cp258_0518	Mannose-6-phosphate isomerase manA 523067:524224 forward
3 Cp258_0791	sucrose-6-phosphate hydrolase 817867:819318 reverse
4 Cp258_0863	Glucanase GlgE 898574:900499 reverse
5 Cp258_1133	Ribulose-phosphate 3-epimerase 1206066:1206740 reverse
6 Cp258_1608	Ribose-5-phosphate isomerase B 1723714:1724148 reverse
7 Cp258_1953	hypothetical protein 2104044:2104232 forward

#### carbon fixation

CDS	Annotation
1 Cp258_1120	phosphoenolpyruvate carboxylase 1189860:1192679 reverse

## cell cycle

	CDS	Annotation
1	Cp258_0720	Septum formation initiator protein 747780:748322 forward
2	Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
3	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
4	Cp258_1410	Cell division protein sepF 1509570:1510010 reverse
5	Cp258_1413	Cell division protein ftsZ 1510919:1512190 reverse
6	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
7	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
8	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
9	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
10	Cp258_1422	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase 1521623:1523134 reverse
11	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
12	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse

## cell division

	CDS	Annotation
1	Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
2	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
3	Cp258_1414	Cell division protein FtsQ 1512465:1513121 reverse
4	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
5	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
6	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
7	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
8	Cp258_1422	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase 1521623:1523134 reverse
9	Cp258_1423	Penicillin-binding protein 1523224:1525107 reverse
10	Cp258_1426	cell division protein MraZ 1527233:1527664 reverse
11	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
12	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse

## cellular carbohydrate metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0610	Citrate synthase 630464:631759 forward

## chromosome segregation

	CDS	Annotation
1	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse

## electron transport chain

	CDS	Annotation
1	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
2	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse

## one-carbon metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0521	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase 526228:527667 forward
2	Cp258_1057	Formate--tetrahydrofolate ligase 1118527:1120179 reverse

## organic acid metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_1848	acetate kinase 1982126:1983328 reverse

---

**oxidation-reduction process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0115	Decaprenylphosphoryl-D-2-keto erythropentose reductase 104736:105497 reverse
2	Cp258_0116	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase 105513:106979 reverse
3	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
4	Cp258_0244	Dihydrolipoamide dehydrogenase 247952:249361 forward
5	Cp258_0246	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit 251333:252091 forward
6	Cp258_0275	glutamyl-tRNA reductase 279268:280632 forward
7	Cp258_0282	Protoporphyrinogen oxidase 288981:290366 forward
8	Cp258_0305	L-lactate dehydrogenase 311901:312863 reverse
9	Cp258_0433	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 432700:434220 forward
10	Cp258_0434	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 434248:435390 forward
11	Cp258_0614	Superoxide dismutase 634058:634678 reverse
12	Cp258_0615	25-diketo-D-gluconic acid reductase A 635117:635977 forward
13	Cp258_0645	succinate-semialdehyde dehydrogenase 667826:669313 forward
14	Cp258_0747	4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl diphosphate reductase 773036:774061 forward
15	Cp258_0898	ketol-acid reductoisomerase 937747:938760 forward
16	Cp258_0900	hypothetical protein 940011:941843 forward
17	Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
18	Cp258_1116	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1186099:1187694 forward
19	Cp258_1123	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1195072:1196076 reverse
20	Cp258_1182	Thiol peroxidase 1260920:1261360 reverse
21	Cp258_1206	Dyp-type peroxidase family protein 1286596:1287903 reverse
22	Cp258_1234	UDP-glucose 4-epimerase 1314513:1315496 forward
23	Cp258_1314	Mycothione/glutathione reductase 1400556:1401947 forward
24	Cp258_1361	Alanine dehydrogenase 1455187:1456296 reverse
25	Cp258_1476	Inosine 5-monophosphate dehydrogenase 1581560:1582993 reverse
26	Cp258_1636	Mycocerosic acid synthase 1754940:1755935 forward
27	Cp258_1650	Bacterioferritin comigratory protein 1764985:1765464 forward
28	Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse
29	Cp258_1747	glutathione peroxidase 1872060:1872533 reverse
30	Cp258_1764	Acetolactate synthase large subunit IlvB1 1890816:1892552 reverse
31	Cp258_1798	Betaine aldehyde dehydrogenase 1929050:1930555 reverse
32	Cp258_1800	choline dehydrogenase 1932918:1934666 forward
33	Cp258_1859	Thiol-disulfide oxidoreductase resA 1992620:1993144 reverse
34	Cp258_1882	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2016862:2018583 reverse
35	Cp258_1909	Aldehyde dehydrogenase 2049663:2051183 reverse
36	Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
37	Cp258_2011	L-lactate dehydrogenase 2181376:2182326 reverse
38	Cp258_2012	Peptide methionine sulfoxide reductase 2182608:2183282 reverse
39	Cp258_2013	Manganese superoxide dismutase 2183625:2184227 forward
40	Cp258_2014	Flavin reductase 2184509:2185093 forward
41	Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse
42	Cp258_2125	Thioredoxin reductase 2305214:2306161 forward
43	Cp258_2126	Thioredoxin 2306223:2306546 forward

---

**phosphorus metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0691	Transcriptional regulatory protein PvdS 714590:715453 forward

---

**response to heat**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1889	ATP-dependent chaperone protein ClpB 2028066:2030615 reverse
2	Cp258_1913	Chaperone protein cofactor 1 2054093:2055283 reverse

---

**response to oxidative stress**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
2	Cp258_1747	glutathione peroxidase 1872060:1872533 reverse

---

**transport**

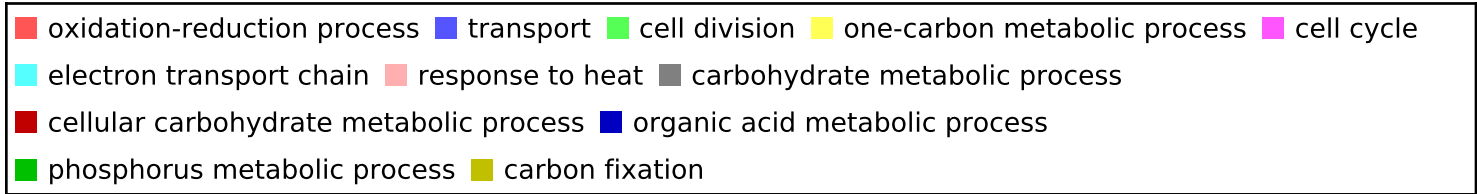
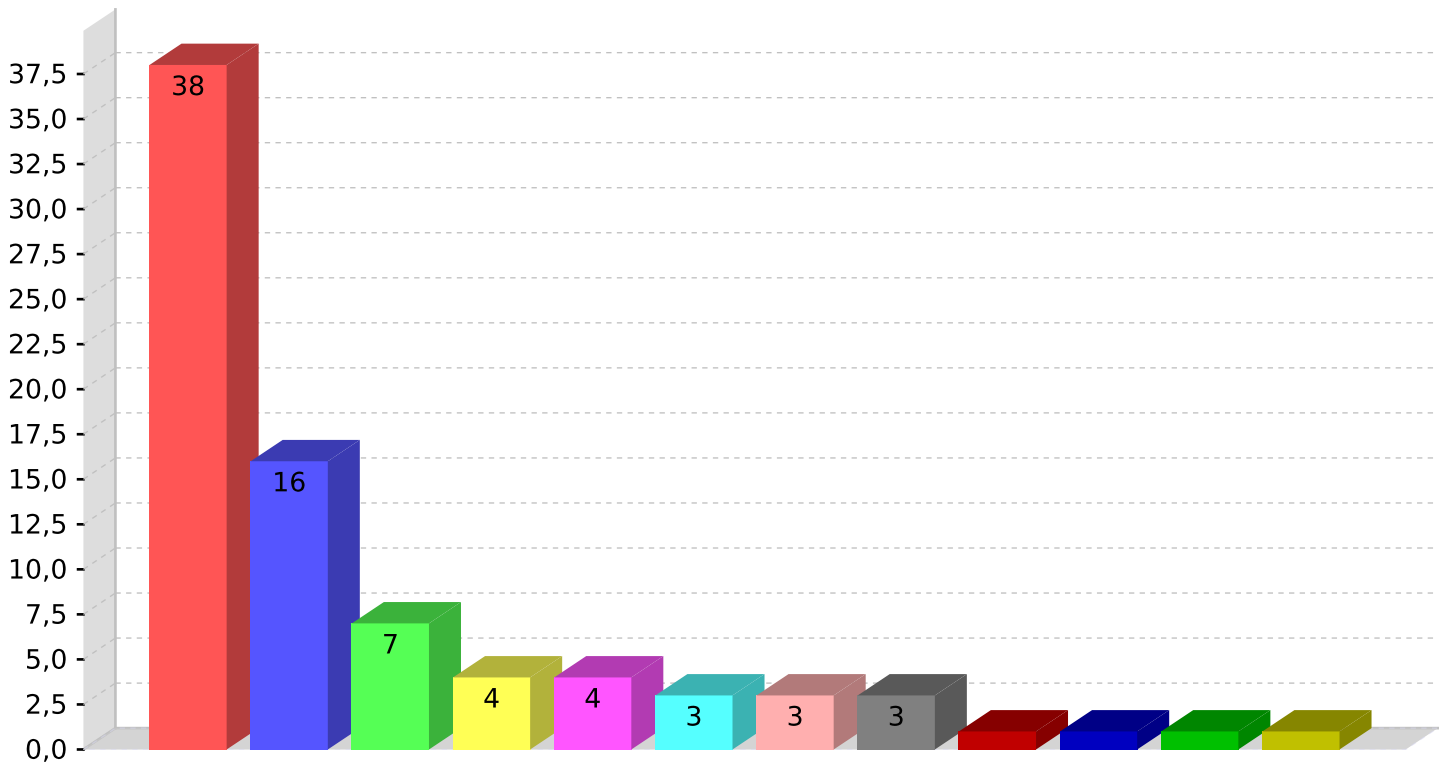
---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0112	Glycine betaine-binding protein 98352:99227 forward
2	Cp258_0146	hypothetical protein 137086:139473 forward
3	Cp258_0453	Manganese ABC transporter membrane protein 452996:453805 forward
4	Cp258_0629	oligopeptide-binding protein OppA 649484:651016 forward
5	Cp258_0680	Glycine betaine transporter 700674:702665 forward
6	Cp258_0764	oligopeptide-binding protein OppA 791678:793258 forward
7	Cp258_1105	FeS assembly ATPase SufC 1171913:1172671 reverse
8	Cp258_1187	oligopeptide-binding protein OppA 1266320:1267963 reverse
9	Cp258_1445	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome B subunit 1545835:1547457 reverse
10	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
11	Cp258_1450	Cytochrome c oxidase subunit II 1551280:1552365 reverse
12	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
13	Cp258_1734	hypothetical protein 1858942:1859586 forward
14	Cp258_1799	High-affinity choline transport protein 1930565:1932712 reverse
15	Cp258_1923	oligopeptide-binding protein OppA 2070649:2072289 reverse

## **ANEXO B**

### **Lista dos transcritos do estímulo térmico (nível 4)**

## GO by Process/ GO Level:4



### carbohydrate metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0415	phosphoglucosamine mutase 416743:418086 forward
2	Cp258_0516	Phosphomannomutase ManB 520508:521887 forward
3	Cp258_0518	Mannose-6-phosphate isomerase manA 523067:524224 forward

### carbon fixation

	CDS	Annotation
1	Cp258_1120	phosphoenolpyruvate carboxylase 1189860:1192679 reverse

### cell cycle

	CDS	Annotation
1	Cp258_0720	Septum formation initiator protein 747780:748322 forward
2	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
3	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
4	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse

---

**cell division**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0582	Cell division protein ftsX 598143:599045 forward
2	Cp258_1350	cell division protein FtsY 1439800:1441446 reverse
3	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
4	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
5	Cp258_1423	Penicillin-binding protein 1523224:1525107 reverse
6	Cp258_1426	cell division protein MraZ 1527233:1527664 reverse
7	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse

---

**cellular carbohydrate metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1597	malate dehydrogenase 1711026:1712006 reverse

---

**electron transport chain**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
2	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
3	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse

---

**one-carbon metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0456	bifunctional protein folD 455004:455849 forward
2	Cp258_0521	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase 526228:527667 forward
3	Cp258_1057	Formate--tetrahydrofolate ligase 1118527:1120179 reverse
4	Cp258_1138	S-adenosylmethionine synthase 1212069:1213298 reverse

---

**organic acid metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1848	acetate kinase 1982126:1983328 reverse

## oxidation-reduction process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0116	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase 105513:106979 reverse
2	Cp258_0246	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit 251333:252091 forward
3	Cp258_0247	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 252110:254125 forward
4	Cp258_0275	glutamyl-tRNA reductase 279268:280632 forward
5	Cp258_0282	Protoporphyrinogen oxidase 288981:290366 forward
6	Cp258_0433	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 432700:434220 forward
7	Cp258_0456	bifunctional protein folD 455004:455849 forward
8	Cp258_0614	Superoxide dismutase 634058:634678 reverse
9	Cp258_0615	25-diketo-D-gluconic acid reductase A 635117:635977 forward
10	Cp258_0703	short-chain dehydrogenase 726012:726866 reverse
11	Cp258_0834	Lactate utilization protein A 867072:867857 reverse
12	Cp258_0900	hypothetical protein 940011:941843 forward
13	Cp258_0902	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 943612:945207 forward
14	Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
15	Cp258_1034	Precorrin-3B synthase 1095270:1096463 forward
16	Cp258_1070	Dihydroorotate dehydrogenase 2 1134417:1135463 forward
17	Cp258_1097	hypothetical protein 1162380:1163744 forward
18	Cp258_1112	Cytochrome oxidase assembly protein 1180241:1181236 forward
19	Cp258_1116	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1186099:1187694 forward
20	Cp258_1182	Thiol peroxidase 1260920:1261360 reverse
21	Cp258_1234	UDP-glucose 4-epimerase 1314513:1315496 forward
22	Cp258_1314	Mycothione/glutathione reductase 1400556:1401947 forward
23	Cp258_1320	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase 1407719:1408894 reverse
24	Cp258_1502	Pyruvate dehydrogenase E1 component 1609234:1611969 forward
25	Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse
26	Cp258_1687	Ferritin-like protein 1805791:1806276 forward
27	Cp258_1688	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha 1806349:1808508 reverse
28	Cp258_1724	TIM-barrel containing enzyme 1849465:1850610 forward
29	Cp258_1764	Acetolactate synthase large subunit llvB1 1890816:1892552 reverse
30	Cp258_1859	Thiol-disulfide oxidoreductase resA 1992620:1993144 reverse
31	Cp258_1882	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2016862:2018583 reverse
32	Cp258_1909	Aldehyde dehydrogenase 2049663:2051183 reverse
33	Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
34	Cp258_2013	Manganese superoxide dismutase 2183625:2184227 forward
35	Cp258_2044	Thioredoxin TrxA 2216427:2216795 reverse
36	Cp258_2062	hypothetical protein 2233858:2234526 forward
37	Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse
38	Cp258_2125	Thioredoxin reductase 2305214:2306161 forward

## phosphorus metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0691	Transcriptional regulatory protein PvdS 714590:715453 forward

## response to heat

	CDS	Annotation
1	Cp258_1534	Chaperone protein dnaJ 1 1639630:1640766 reverse
2	Cp258_1889	ATP-dependent chaperone protein ClpB 2028066:2030615 reverse
3	Cp258_1913	Chaperone protein cofactor 1 2054093:2055283 reverse



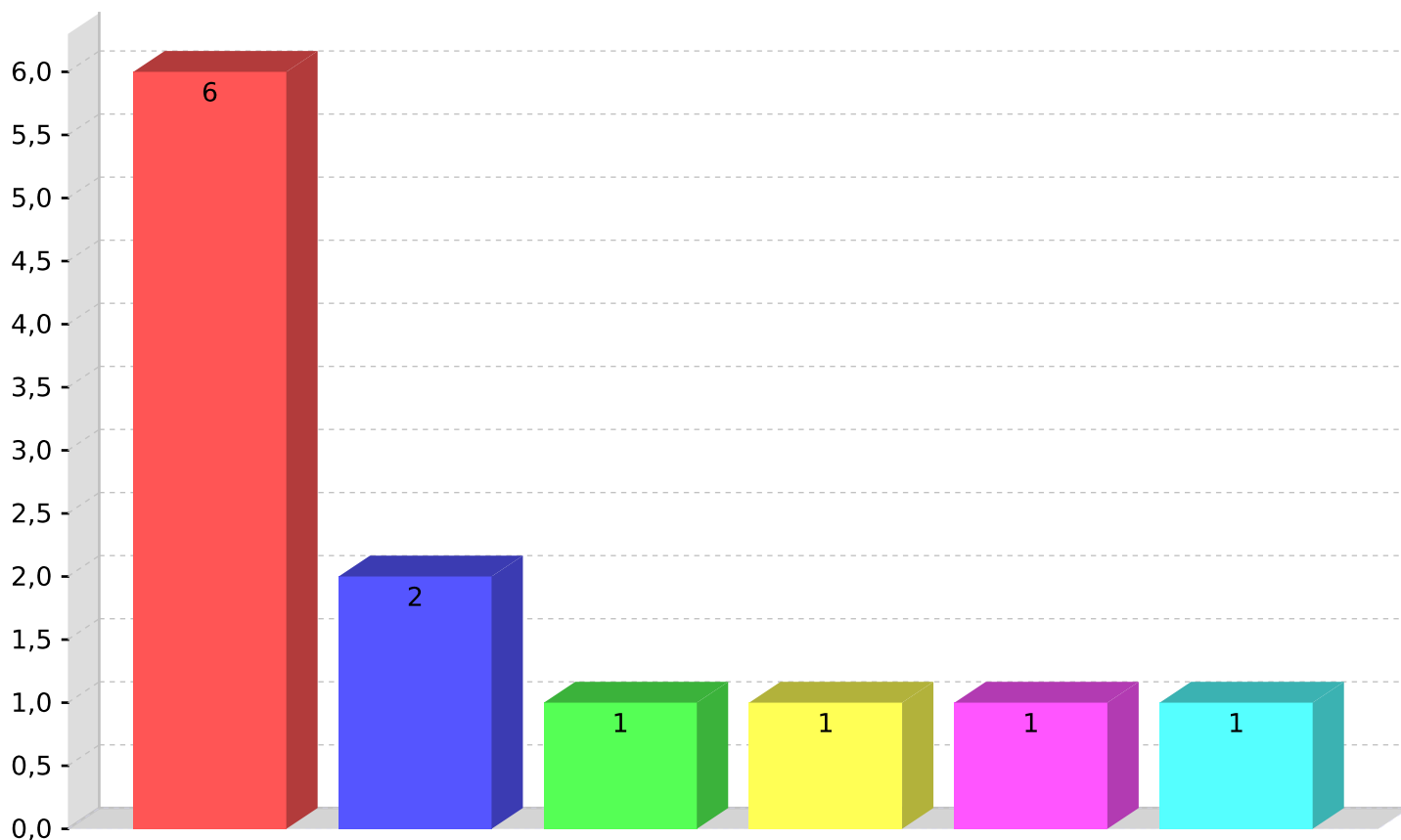
## transport

	CDS	Annotation
1	Cp258_0112	Glycine betaine-binding protein 98352:99227 forward
2	Cp258_0370	Serine transporter 373687:375060 forward
3	Cp258_0386	Maltose transport system permease protein 386388:387794 forward
4	Cp258_0391	Glycerol-3-phosphate-transporting ATPase 391896:393032 reverse
5	Cp258_0629	oligopeptide-binding protein OppA 649484:651016 forward
6	Cp258_0764	oligopeptide-binding protein OppA 791678:793258 forward
7	Cp258_0778	hypothetical protein 806137:806694 forward
8	Cp258_1105	FeS assembly ATPase SufC 1171913:1172671 reverse
9	Cp258_1187	oligopeptide-binding protein OppA 1266320:1267963 reverse
10	Cp258_1445	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome B subunit 1545835:1547457 reverse
11	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
12	Cp258_1558	oligopeptide transport system permease OppC 1667727:1668590 forward
13	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
14	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse
15	Cp258_1922	oligopeptide transport system permease OppB 2069573:2070568 reverse
16	Cp258_1923	oligopeptide-binding protein OppA 2070649:2072289 reverse

## **ANEXO C**

### **Lista dos transcritos do estímulo osmótico (nível 4)**

## GO by Process/ GO Level:4



■ oxidation-reduction process 
 ■ cell division 
 ■ organic acid metabolic process 
 ■ transport 
 ■ cell cycle 
 ■ one-carbon metabolic process

### cell cycle

	CDS	Annotation
1	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse

### cell division

	CDS	Annotation
1	Cp258_1426	cell division protein MraZ 1527233:1527664 reverse
2	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse

### one-carbon metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0456	bifunctional protein folD 455004:455849 forward

### organic acid metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_1848	acetate kinase 1982126:1983328 reverse

---

**oxidation-reduction process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0244	Dihydrolipoamide dehydrogenase 247952:249361 forward
2	Cp258_0247	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 252110:254125 forward
3	Cp258_0305	L-lactate dehydrogenase 311901:312863 reverse
4	Cp258_0456	bifunctional protein fold 455004:455849 forward
5	Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
6	Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse

---

**transport**

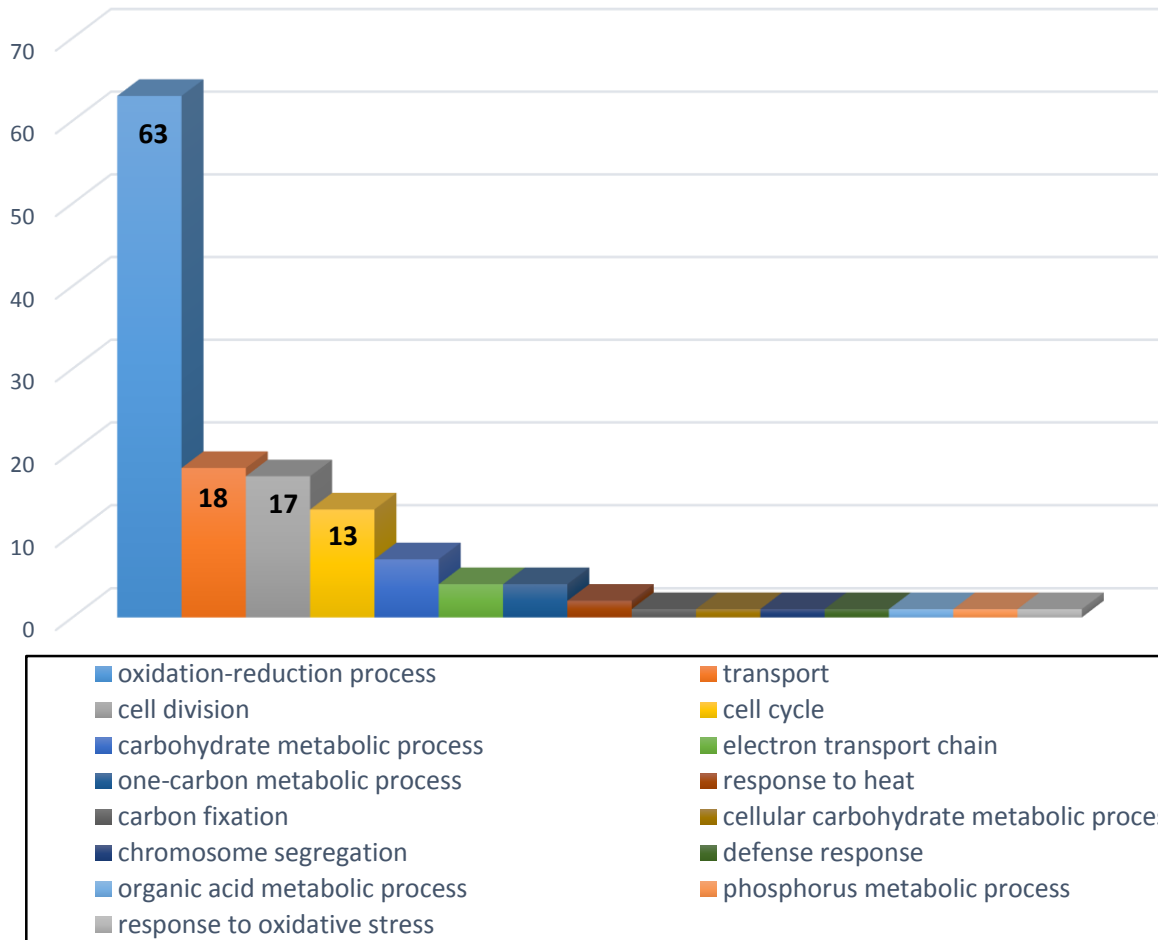
---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0370	Serine transporter 373687:375060 forward

## **ANEXO D**

### **Lista dos transcritos da condição fisiológica (nível 4)**

## GO by Process/ GO Level:4



### carbohydrate metabolic process

CDS	Annotation
1 Cp258_0415	phosphoglucosamine mutase 416743:418086 forward
2 Cp258_0516	Phosphomannomutase ManB 520508:521887 forward
3 Cp258_0518	Mannose-6-phosphate isomerase manA 523067:524224 forward
4 Cp258_0863	Glucanase GlgE 898574:900499 reverse
5 Cp258_1133	Ribulose-phosphate 3-epimerase 1206066:1206740 reverse
6 Cp258_1608	Ribose-5-phosphate isomerase B 1723714:1724148 reverse
7 Cp258_1704	Phosphoglucomutase 1821635:1823272 reverse

### carbon fixation

CDS	Annotation
1 Cp258_1120	phosphoenolpyruvate carboxylase 1189860:1192679 reverse

### cell cycle

CDS	Annotation
1 Cp258_0720	Septum formation initiator protein 747780:748322 forward
2 Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse

---

**cell cycle**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
3	Cp258_1410	Cell division protein sepF 1509570:1510010 reverse
4	Cp258_1413	Cell division protein ftsZ 1510919:1512190 reverse
5	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
6	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
7	Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879
8	Cp258_1419	reverse
9	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
10	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase
11	Cp258_1422	1521623:1523134 reverse
12	Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
13	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse

---

**cell division**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0581	Cell division ATP-binding protein FtsE 597432:598121 forward
2	Cp258_0582	Cell division protein ftsX 598143:599045 forward
3	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
4	Cp258_1350	cell division protein FtsY 1439800:1441446 reverse
5	Cp258_1414	Cell division protein FtsQ 1512465:1513121 reverse
6	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
7	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
8	Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879
9	Cp258_1419	reverse
10	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
11	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase
12	Cp258_1422	1521623:1523134 reverse
13	Cp258_1423	Penicillin-binding protein 1523224:1525107 reverse
14	Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
15	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
16	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse
17	Cp258_1809	cell division protein 1938797:1940800 reverse

---

**cellular carbohydrate metabolic process**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0610	Citrate synthase 630464:631759 forward
2	Cp258_1597	malate dehydrogenase 1711026:1712006 reverse

---

**chromosome segregation**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse

---

**defense response**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_1510	Thiamine biosynthesis protein X 1617500:1618081 forward

---

**electron transport chain**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
2	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
3	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse
4	Cp258_1863	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 1996085:1997536 reverse

---

**one-carbon metabolic process**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0456	bifunctional protein fold 455004:455849 forward
2	Cp258_0521	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase 526228:527667 forward
3	Cp258_1057	Formate--tetrahydrofolate ligase 1118527:1120179 reverse
4	Cp258_1138	S-adenosylmethionine synthase 1212069:1213298 reverse

---

**organic acid metabolic process**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_1848	acetate kinase 1982126:1983328 reverse

---

**oxidation-reduction process**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0115	Decaprenylphosphoryl-D-2-keto erythropentose reductase 104736:105497 reverse
2	Cp258_0116	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase 105513:106979 reverse
3	Cp258_0183	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase 181944:182975 forward
4	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
5	Cp258_0244	Dihydrolipoamide dehydrogenase 247952:249361 forward
6	Cp258_0246	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit 251333:252091 forward
7	Cp258_0247	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 252110:254125 forward
8	Cp258_0254	pyruvate formate-lyase activating enzyme 258724:259593 reverse
9	Cp258_0275	glutamyl-tRNA reductase 279268:280632 forward
10	Cp258_0282	Protoporphyrinogen oxidase 288981:290366 forward
11	Cp258_0286	Thiol-disulfide isomerase/thioredoxin 293241:293825 forward
12	Cp258_0287	Cytochrome c-type biogenesis protein CcdA 293822:294628 forward
13	Cp258_0305	L-lactate dehydrogenase 311901:312863 reverse
14	Cp258_0433	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 432700:434220 forward
15	Cp258_0434	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 434248:435390 forward



---

**oxidation-reduction process**

---

<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
16 Cp258_0456	bifunctional protein fold 455004:455849 forward
17 Cp258_0482	flavoprotein disulfide reductase 484272:485741 forward
18 Cp258_0563	Copper-containing nitrite reductase 573200:575848 forward
19 Cp258_0614	Superoxide dismutase 634058:634678 reverse
20 Cp258_0615	25-diketo-D-gluconic acid reductase A 635117:635977 forward
21 Cp258_0645	succinate-semialdehyde dehydrogenase 667826:669313 forward
28 Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
29 Cp258_1034	Precorrin-3B synthase 1095270:1096463 forward
30 Cp258_1038	Precorrin-4 C11-methyltransferase 1099390:1100163 reverse
31 Cp258_1070	Dihydroorotate dehydrogenase 2 1134417:1135463 forward
32 Cp258_1080	Dehydrogenase/oxidoreductase 1141638:1143110 forward
33 Cp258_1097	hypothetical protein 1162380:1163744 forward
34 Cp258_1123	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1195072:1196076 reverse
35 Cp258_1131	riboflavin synthase subunit alpha 1204230:1204871 reverse
36 Cp258_1132	Riboflavin biosynthesis protein ribD 1204991:1206076 reverse
37 Cp258_1182	Thiol peroxidase 1260920:1261360 reverse
38 Cp258_1206	Dyp-type peroxidase family protein 1286596:1287903 reverse
39 Cp258_1234	UDP-glucose 4-epimerase 1314513:1315496 forward
40 Cp258_1238	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD 1320780:1321304 reverse
41 Cp258_1239	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 1321446:1322042 reverse
42 Cp258_1244	NrdR family transcriptional regulator 1328641:1328871 reverse
43 Cp258_1314	Mycothione/glutathione reductase 1400556:1401947 forward 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase 1407719:1408894 reverse
44 Cp258_1320	
45 Cp258_1361	Alanine dehydrogenase 1455187:1456296 reverse
46 Cp258_1449	Cytochrome c oxidase polypeptide 4 1550827:1551258 reverse
47 Cp258_1502	Pyruvate dehydrogenase E1 component 1609234:1611969 forward
48 Cp258_1636	Mycocerosic acid synthase 1754940:1755935 forward
49 Cp258_1650	Bacterioferritin comigratory protein 1764985:1765464 forward
50 Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse
51 Cp258_1688	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha 1806349:1808508 reverse
52 Cp258_1720	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2 1843097:1844080 forward
53 Cp258_1724	TIM-barrel containing enzyme 1849465:1850610 forward
54 Cp258_1764	Acetolactate synthase large subunit llvB1 1890816:1892552 reverse
55 Cp258_1859	Thiol-disulfide oxidoreductase resA 1992620:1993144 reverse
56 Cp258_1882	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2016862:2018583 reverse
57 Cp258_1909	Aldehyde dehydrogenase 2049663:2051183 reverse
58 Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
59 Cp258_2011	L-lactate dehydrogenase 2181376:2182326 reverse
60 Cp258_2013	Manganese superoxide dismutase 2183625:2184227 forward
61 Cp258_2044	Thioredoxin TrxA 2216427:2216795 reverse
62 Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse
63 Cp258_2126	Thioredoxin 2306223:2306546 forward

---

**phosphorus metabolic process**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0691	Transcriptional regulatory protein PvdS 714590:715453 forward

---

**response to heat**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_1534	Chaperone protein dnaJ 1 1639630:1640766 reverse
2	Cp258_1889	ATP-dependent chaperone protein ClpB 2028066:2030615 reverse

---

**response to oxidative stress**

---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward

---

**transport**

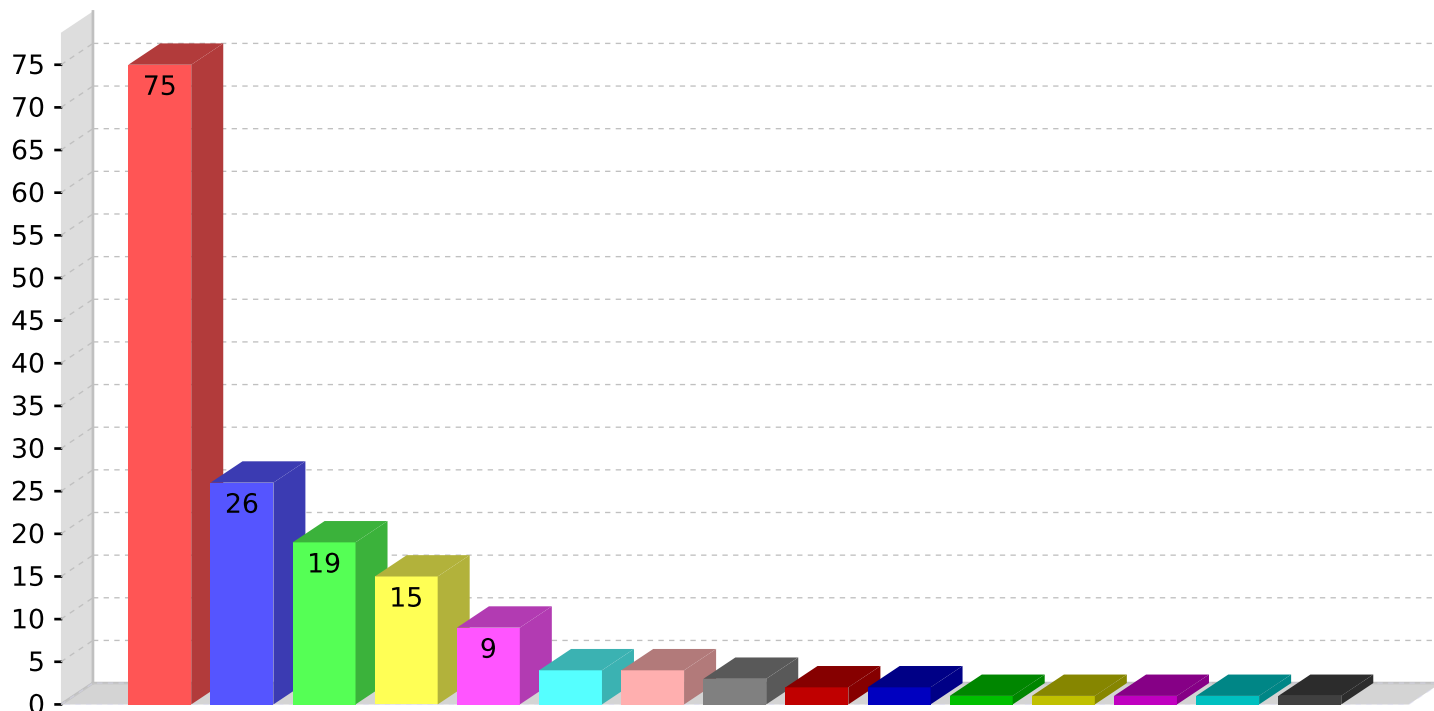
---

	<b>CDS</b>	<b>Annotation</b>
1	Cp258_0370	Serine transporter 373687:375060 forward
2	Cp258_0386	Maltose transport system permease protein 386388:387794 forward
3	Cp258_0387	Maltose transport system permease 387794:388672 forward
4	Cp258_0391	Glycerol-3-phosphate-transporting ATPase 391896:393032 reverse
5	Cp258_0508	Maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein 512355:513647 reverse
6	Cp258_0629	oligopeptide-binding protein OppA 649484:651016 forward
7	Cp258_0680	Glycine betaine transporter 700674:702665 forward
8	Cp258_0764	oligopeptide-binding protein OppA 791678:793258 forward
9	Cp258_0773	Monoacyl phosphatidylinositol tetramannoside-binding protein LpqW 801714:803186 forward
10	Cp258_1187	oligopeptide-binding protein OppA 1266320:1267963 reverse
11	Cp258_1445	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome B subunit 1545835:1547457 reverse
12	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
13	Cp258_1450	Cytochrome c oxidase subunit II 1551280:1552365 reverse
14	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
15	Cp258_1734	hypothetical protein 1858942:1859586 forward
16	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse
17	Cp258_1863	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 1996085:1997536 reverse
18	Cp258_1923	oligopeptide-binding protein OppA 2070649:2072289 reverse

## **ANEXO E**

**Lista dos transcritos de todas as condições (nível 4)**

## GO by Process/ GO Level:4



- oxidation-reduction process
- transport
- cell division
- cell cycle
- carbohydrate metabolic process
- electron transport chain
- one-carbon metabolic process
- response to heat
- response to oxidative stress
- cellular carbohydrate metabolic process
- organic acid metabolic process
- chromosome segregation
- carbon fixation
- phosphorus metabolic process
- defense response

### carbohydrate metabolic process

CDS	Annotation
Cp258_0415	phosphoglucosamine mutase 416743:418086 forward
Cp258_0516	Phosphomannomutase ManB 520508:521887 forward
Cp258_0518	Mannose-6-phosphate isomerase manA 523067:524224 forward
Cp258_0791	sucrose-6-phosphate hydrolase 817867:819318 reverse
Cp258_0863	Glucanase GlgE 898574:900499 reverse
Cp258_1133	Ribulose-phosphate 3-epimerase 1206066:1206740 reverse
Cp258_1608	Ribose-5-phosphate isomerase B 1723714:1724148 reverse
Cp258_1704	Phosphoglucomutase 1821635:1823272 reverse
Cp258_1953	hypothetical protein 2104044:2104232 forward

### carbon fixation

CDS	Annotation
Cp258_1120	phosphoenolpyruvate carboxylase 1189860:1192679 reverse

## cell cycle

	CDS	Annotation
1	Cp258_0720	Septum formation initiator protein 747780:748322 forward
2	Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
3	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
4	Cp258_1410	Cell division protein sepF 1509570:1510010 reverse
5	Cp258_1413	Cell division protein ftsZ 1510919:1512190 reverse
6	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
7	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
8	Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse
9	Cp258_1419	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879 reverse
10	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
11	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
12	Cp258_1422	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase 1521623:1523134 reverse
13	Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
14	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
15	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse

## cell division

	CDS	Annotation
1	Cp258_0581	Cell division ATP-binding protein FtsE 597432:598121 forward
2	Cp258_0582	Cell division protein ftsX 598143:599045 forward
3	Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
4	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
5	Cp258_1350	cell division protein FtsY 1439800:1441446 reverse
6	Cp258_1414	Cell division protein FtsQ 1512465:1513121 reverse
7	Cp258_1415	UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase 1513137:1514594 reverse
8	Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
9	Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse
10	Cp258_1419	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879 reverse
11	Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
12	Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
13	Cp258_1422	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2 6-diaminopimelate ligase 1521623:1523134 reverse
14	Cp258_1423	Penicillin-binding protein 1523224:1525107 reverse
15	Cp258_1426	cell division protein MraZ 1527233:1527664 reverse
16	Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
17	Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
18	Cp258_1711	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1833584:1834822 reverse
19	Cp258_1809	cell division protein 1938797:1940800 reverse

## cellular carbohydrate metabolic process

	CDS	Annotation
1	Cp258_0610	Citrate synthase 630464:631759 forward
2	Cp258_1597	malate dehydrogenase 1711026:1712006 reverse

## chromosome segregation

	CDS	Annotation
1	Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse

## defense response

	CDS	Annotation
1	Cp258_1510	Thiamine biosynthesis protein X 1617500:1618081 forward

---

**electron transport chain**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
2	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
3	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse
4	Cp258_1863	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 1996085:1997536 reverse

---

**one-carbon metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0456	bifunctional protein foID 455004:455849 forward
2	Cp258_0521	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase 526228:527667 forward
3	Cp258_1057	Formate--tetrahydrofolate ligase 1118527:1120179 reverse
4	Cp258_1138	S-adenosylmethionine synthase 1212069:1213298 reverse

---

**organic acid metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1848	acetate kinase 1982126:1983328 reverse

**oxidation-reduction process**

	CDS	Annotation
1	Cp258_0115	Decaprenylphosphoryl-D-2-keto erythropentose reductase 104736:105497 reverse
2	Cp258_0116	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase 105513:106979 reverse
3	Cp258_0183	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase 181944:182975 forward
4	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
5	Cp258_0244	Dihydrolipoamide dehydrogenase 247952:249361 forward
6	Cp258_0246	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit 251333:252091 forward
7	Cp258_0247	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 252110:254125 forward
8	Cp258_0254	pyruvate formate-lyase activating enzyme 258724:259593 reverse
9	Cp258_0275	glutamyl-tRNA reductase 279268:280632 forward
10	Cp258_0282	Protoporphyrinogen oxidase 288981:290366 forward
11	Cp258_0286	Thiol-disulfide isomerase/thioredoxin 293241:293825 forward
12	Cp258_0287	Cytochrome c-type biogenesis protein CcdA 293822:294628 forward
13	Cp258_0305	L-lactate dehydrogenase 311901:312863 reverse
14	Cp258_0433	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 432700:434220 forward
15	Cp258_0434	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 434248:435390 forward
16	Cp258_0456	bifunctional protein folD 455004:455849 forward
17	Cp258_0482	flavoprotein disulfide reductase 484272:485741 forward
18	Cp258_0563	Copper-containing nitrite reductase 573200:575848 forward
19	Cp258_0614	Superoxide dismutase 634058:634678 reverse
20	Cp258_0615	25-diketo-D-gluconic acid reductase A 635117:635977 forward
21	Cp258_0645	succinate-semialdehyde dehydrogenase 667826:669313 forward
22	Cp258_0703	short-chain dehydrogenase 726012:726866 reverse
23	Cp258_0747	4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl diphosphate reductase 773036:774061 forward
24	Cp258_0769	Arsenate reductase 797752:798096 reverse
25	Cp258_0834	Lactate utilization protein A 867072:867857 reverse
26	Cp258_0898	ketol-acid reductoisomerase 937747:938760 forward
27	Cp258_0900	hypothetical protein 940011:941843 forward
28	Cp258_0902	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 943612:945207 forward
29	Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
30	Cp258_1034	Precorrin-3B synthase 1095270:1096463 forward
31	Cp258_1038	Precorrin-4 C11-methyltransferase 1099390:1100163 reverse
32	Cp258_1070	Dihydroorotate dehydrogenase 2 1134417:1135463 forward
33	Cp258_1080	Dehydrogenase/oxidoreductase 1141638:1143110 forward
34	Cp258_1097	hypothetical protein 1162380:1163744 forward
35	Cp258_1112	Cytochrome oxidase assembly protein 1180241:1181236 forward
36	Cp258_1116	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1186099:1187694 forward
37	Cp258_1123	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1195072:1196076 reverse
38	Cp258_1131	riboflavin synthase subunit alpha 1204230:1204871 reverse
39	Cp258_1132	Riboflavin biosynthesis protein ribD 1204991:1206076 reverse
40	Cp258_1182	Thiol peroxidase 1260920:1261360 reverse
41	Cp258_1206	Dyp-type peroxidase family protein 1286596:1287903 reverse
42	Cp258_1234	UDP-glucose 4-epimerase 1314513:1315496 forward
43	Cp258_1238	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD 1320780:1321304 reverse
44	Cp258_1239	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 1321446:1322042 reverse
45	Cp258_1244	NrdR family transcriptional regulator 1328641:1328871 reverse
46	Cp258_1314	Mycothione/glutathione reductase 1400556:1401947 forward
47	Cp258_1320	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase 1407719:1408894 reverse
48	Cp258_1361	Alanine dehydrogenase 1455187:1456296 reverse
49	Cp258_1449	Cytochrome c oxidase polypeptide 4 1550827:1551258 reverse
50	Cp258_1476	Inosine 5-monophosphate dehydrogenase 1581560:1582993 reverse
51	Cp258_1502	Pyruvate dehydrogenase E1 component 1609234:1611969 forward
52	Cp258_1636	Mycocerosic acid synthase 1754940:1755935 forward
53	Cp258_1650	Bacterioferritin comigratory protein 1764985:1765464 forward

---

**oxidation-reduction process**

---

	CDS	Annotation
54	Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse
55	Cp258_1687	Ferritin-like protein 1805791:1806276 forward
56	Cp258_1688	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha 1806349:1808508 reverse
57	Cp258_1720	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2 1843097:1844080 forward
58	Cp258_1724	TIM-barrel containing enzyme 1849465:1850610 forward
59	Cp258_1747	glutathione peroxidase 1872060:1872533 reverse
60	Cp258_1764	Acetolactate synthase large subunit llvB1 1890816:1892552 reverse
61	Cp258_1798	Betaine aldehyde dehydrogenase 1929050:1930555 reverse
62	Cp258_1800	choline dehydrogenase 1932918:1934666 forward
63	Cp258_1859	Thiol-disulfide oxidoreductase resA 1992620:1993144 reverse
64	Cp258_1882	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2016862:2018583 reverse
65	Cp258_1909	Aldehyde dehydrogenase 2049663:2051183 reverse
66	Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
67	Cp258_2011	L-lactate dehydrogenase 2181376:2182326 reverse
68	Cp258_2012	Peptide methionine sulfoxide reductase 2182608:2183282 reverse
69	Cp258_2013	Manganese superoxide dismutase 2183625:2184227 forward
70	Cp258_2014	Flavin reductase 2184509:2185093 forward
71	Cp258_2044	Thioredoxin TrxA 2216427:2216795 reverse
72	Cp258_2062	hypothetical protein 2233858:2234526 forward
73	Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse
74	Cp258_2125	Thioredoxin reductase 2305214:2306161 forward
75	Cp258_2126	Thioredoxin 2306223:2306546 forward

---

**phosphorus metabolic process**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0691	Transcriptional regulatory protein PvdS 714590:715453 forward

---

**response to heat**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_1534	Chaperone protein dnaJ 1 1639630:1640766 reverse
2	Cp258_1889	ATP-dependent chaperone protein ClpB 2028066:2030615 reverse
3	Cp258_1913	Chaperone protein cofactor 1 2054093:2055283 reverse

---

**response to oxidative stress**

---

	CDS	Annotation
1	Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
2	Cp258_1747	glutathione peroxidase 1872060:1872533 reverse



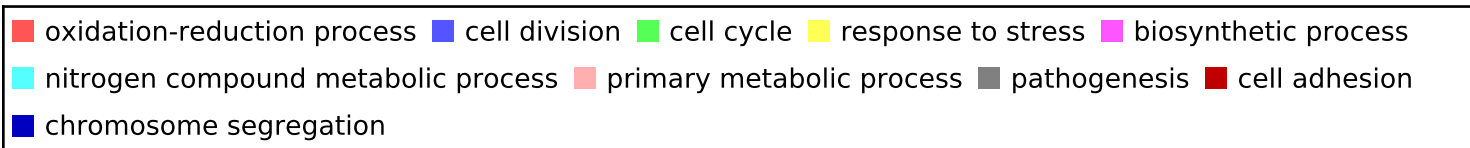
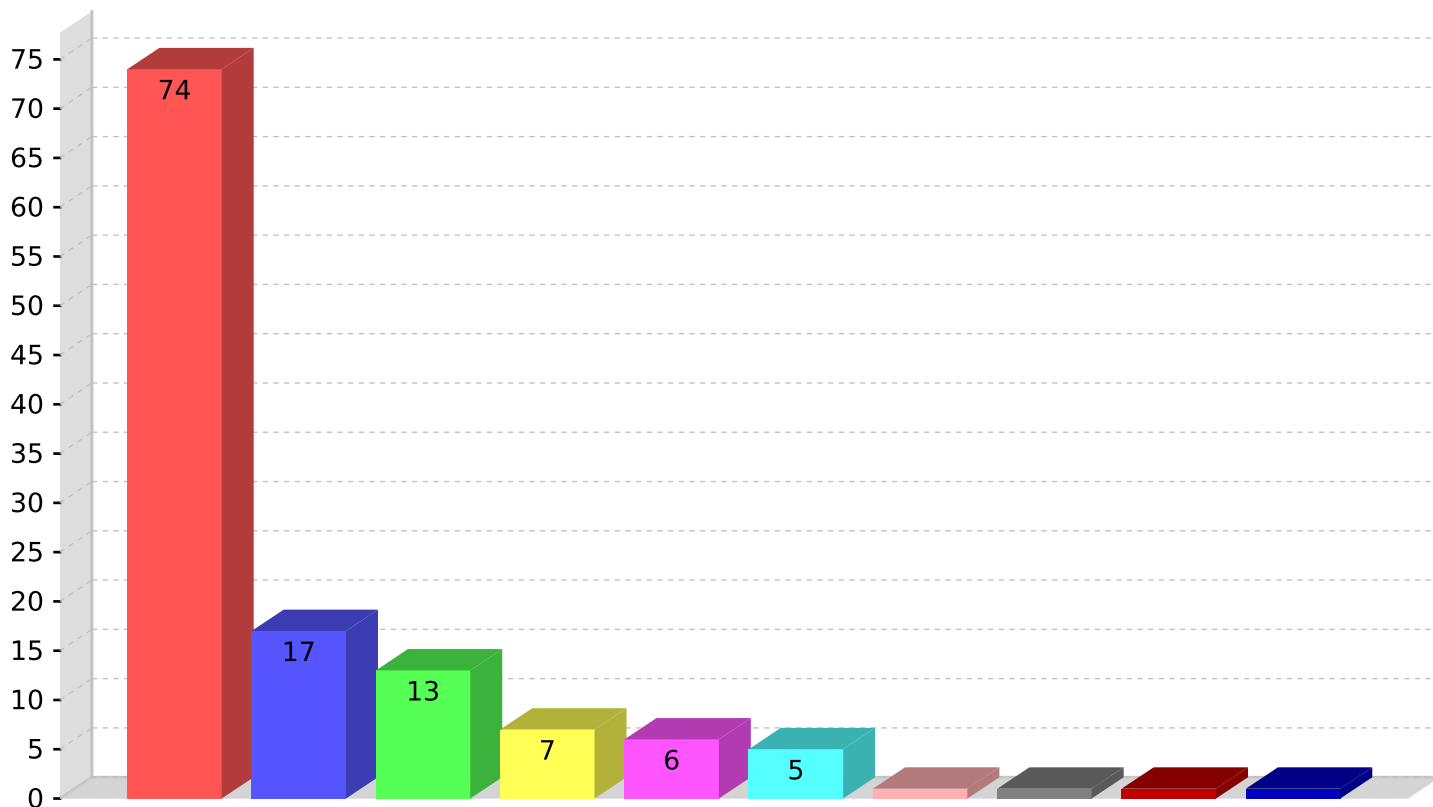
**transport**

	CDS	Annotation
1	Cp258_0112	Glycine betaine-binding protein 98352:99227 forward
2	Cp258_0146	hypothetical protein 137086:139473 forward
3	Cp258_0370	Serine transporter 373687:375060 forward
4	Cp258_0386	Maltose transport system permease protein 386388:387794 forward
5	Cp258_0387	Maltose transport system permease 387794:388672 forward
6	Cp258_0391	Glycerol-3-phosphate-transporting ATPase 391896:393032 reverse
7	Cp258_0453	Manganese ABC transporter membrane protein 452996:453805 forward
8	Cp258_0508	Maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein 512355:513647 reverse
9	Cp258_0629	oligopeptide-binding protein OppA 649484:651016 forward
10	Cp258_0680	Glycine betaine transporter 700674:702665 forward
11	Cp258_0764	oligopeptide-binding protein OppA 791678:793258 forward
12	Cp258_0773	Monoacyl phosphatidylinositol tetramannoside-binding protein LpqW 801714:803186 forward
13	Cp258_0778	hypothetical protein 806137:806694 forward
14	Cp258_1105	FeS assembly ATPase SufC 1171913:1172671 reverse
15	Cp258_1187	oligopeptide-binding protein OppA 1266320:1267963 reverse
16	Cp258_1445	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome B subunit 1545835:1547457 reverse
17	Cp258_1446	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 1547454:1548674 reverse
18	Cp258_1450	Cytochrome c oxidase subunit II 1551280:1552365 reverse
19	Cp258_1558	oligopeptide transport system permease OppC 1667727:1668590 forward
20	Cp258_1684	Cytochrome C oxidase polypeptide I 1802169:1803890 reverse
21	Cp258_1734	hypothetical protein 1858942:1859586 forward
22	Cp258_1799	High-affinity choline transport protein 1930565:1932712 reverse
23	Cp258_1854	disulfide bond formation protein 1989700:1991190 reverse
24	Cp258_1863	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 1996085:1997536 reverse
25	Cp258_1922	oligopeptide transport system permease OppB 2069573:2070568 reverse
26	Cp258_1923	oligopeptide-binding protein OppA 2070649:2072289 reverse

## **ANEXO F**

**Lista dos transcritos de todas as condições (nível 3)**

### GO by Process/ GO Level:3



#### biosynthetic process

CDS	Annotation
Cp258_0167	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase 158676:159968 reverse
Cp258_0672	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 692922:693851 forward
Cp258_0777	N-succinyldiaminopimelate aminotransferase 804864:805958 forward
Cp258_0793	Glycosyl transferase 820119:821291 reverse
Cp258_1496	Cobalamin-biosynthesis related aminotransferase 1604103:1605245 reverse
Cp258_1969	Phthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsA 2124280:2129115 reverse

#### cell adhesion

CDS	Annotation
Cp258_1781	hypothetical protein 1909682:1911079 reverse

---

**cell cycle**

---

CDS	Annotation
Cp258_0720	Septum formation initiator protein 747780:748322 forward
Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
Cp258_1410	Cell division protein sepF 1509570:1510010 reverse
Cp258_1413	Cell division protein ftsZ 1510919:1512190 reverse
Cp258_1414	Cell division protein FtsQ 1512465:1513121 reverse
Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse
Cp258_1419	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879 reverse
Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse

---

**cell division**

---

CDS	Annotation
Cp258_0581	Cell division ATP-binding protein FtsE 597432:598121 forward
Cp258_0582	Cell division protein ftsX 598143:599045 forward
Cp258_0730	Undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 756342:757139 forward
Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse
Cp258_1350	cell division protein FtsY 1439800:1441446 reverse
Cp258_1414	Cell division protein FtsQ 1512465:1513121 reverse
Cp258_1417	N-acetyl glucosaminyl transferase 1514722:1515807 reverse
Cp258_1418	Cell division protein ftsW 1515807:1517393 reverse
Cp258_1419	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase 1517494:1518879 reverse
Cp258_1420	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase 1518883:1519983 reverse
Cp258_1421	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase 1519987:1521537 reverse
Cp258_1423	Penicillin-binding protein 1523224:1525107 reverse
Cp258_1426	cell division protein MraZ 1527233:1527664 reverse
Cp258_1526	undecaprenyl pyrophosphate synthase 1632433:1633170 reverse
Cp258_1603	trigger factor Tig 1719209:1720561 reverse
Cp258_1809	cell division protein 1938797:1940800 reverse

---

**chromosome segregation**

---

CDS	Annotation
Cp258_1281	DNA translocase ftsK 1361252:1364248 reverse

---

**nitrogen compound metabolic process**

---

CDS	Annotation
Cp258_0563	Copper-containing nitrite reductase 573200:575848 forward
Cp258_1031	apolipoprotein N-acyltransferase 1088971:1090527 reverse
Cp258_1863	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 1996085:1997536 reverse
Cp258_1905	hypothetical protein 2046210:2047046 reverse
Cp258_1933	urease accessory protein UreD 2082232:2083110 reverse

**oxidation-reduction process**

CDS	Annotation
Cp258_0115	Decaprenylphosphoryl-D-2-keto erythropentose reductase 104736:105497 reverse
Cp258_0116	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase 105513:106979 reverse
Cp258_0183	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase 181944:182975 forward
Cp258_0185	catalase 183750:185288 forward
Cp258_0244	Dihydrolipoamide dehydrogenase 247952:249361 forward
Cp258_0246	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit 251333:252091 forward
Cp258_0247	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 252110:254125 forward
Cp258_0254	pyruvate formate-lyase activating enzyme 258724:259593 reverse
Cp258_0275	glutamyl-tRNA reductase 279268:280632 forward
Cp258_0282	Protoporphyrinogen oxidase 288981:290366 forward
Cp258_0286	Thiol-disulfide isomerase/thioredoxin 293241:293825 forward
Cp258_0287	Cytochrome c-type biogenesis protein CcdA 293822:294628 forward
Cp258_0305	L-lactate dehydrogenase 311901:312863 reverse
Cp258_0433	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 432700:434220 forward
Cp258_0434	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 434248:435390 forward
Cp258_0456	bifunctional protein folD 455004:455849 forward
Cp258_0482	flavoprotein disulfide reductase 484272:485741 forward
Cp258_0563	Copper-containing nitrite reductase 573200:575848 forward
Cp258_0614	Superoxide dismutase 634058:634678 reverse
Cp258_0615	25-diketo-D-gluconic acid reductase A 635117:635977 forward
Cp258_0645	succinate-semialdehyde dehydrogenase 667826:669313 forward
Cp258_0703	short-chain dehydrogenase 726012:726866 reverse
Cp258_0747	4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl diphosphate reductase 773036:774061 forward
Cp258_0769	Arsenate reductase 797752:798096 reverse
Cp258_0834	Lactate utilization protein A 867072:867857 reverse
Cp258_0898	ketol-acid reductoisomerase 937747:938760 forward
Cp258_0900	hypothetical protein 940011:941843 forward
Cp258_0902	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 943612:945207 forward
Cp258_1023	NADH dehydrogenase 1081278:1082636 reverse
Cp258_1034	Precorrin-3B synthase 1095270:1096463 forward
Cp258_1038	Precorrin-4 C11-methyltransferase 1099390:1100163 reverse
Cp258_1070	Dihydroorotate dehydrogenase 2 1134417:1135463 forward
Cp258_1080	Dehydrogenase/oxidoreductase 1141638:1143110 forward
Cp258_1097	hypothetical protein 1162380:1163744 forward
Cp258_1112	Cytochrome oxidase assembly protein 1180241:1181236 forward
Cp258_1116	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1186099:1187694 forward
Cp258_1123	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1195072:1196076 reverse
Cp258_1131	riboflavin synthase subunit alpha 1204230:1204871 reverse
Cp258_1132	Riboflavin biosynthesis protein ribD 1204991:1206076 reverse
Cp258_1182	Thiol peroxidase 1260920:1261360 reverse
Cp258_1206	Dyp-type peroxidase family protein 1286596:1287903 reverse
Cp258_1234	UDP-glucose 4-epimerase 1314513:1315496 forward
Cp258_1238	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD 1320780:1321304 reverse
Cp258_1239	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 1321446:1322042 reverse
Cp258_1243	ATP-dependent RNA helicase hrpA 1324730:1328644 forward
Cp258_1244	NrdR family transcriptional regulator 1328641:1328871 reverse
Cp258_1314	Mycothione/glutathione reductase 1400556:1401947 forward
Cp258_1320	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase 1407719:1408894 reverse
Cp258_1361	Alanine dehydrogenase 1455187:1456296 reverse
Cp258_1476	Inosine 5-monophosphate dehydrogenase 1581560:1582993 reverse
Cp258_1636	Mycocerosic acid synthase 1754940:1755935 forward
Cp258_1650	Bacterioferritin comigratory protein 1764985:1765464 forward
Cp258_1686	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta 1804359:1805345 reverse

---

**oxidation-reduction process**

---

CDS	Annotation
Cp258_1687	Ferritin-like protein 1805791:1806276 forward
Cp258_1688	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha 1806349:1808508 reverse
Cp258_1720	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2 1843097:1844080 forward
Cp258_1724	TIM-barrel containing enzyme 1849465:1850610 forward
Cp258_1748	Protease II 1872530:1874656 reverse
Cp258_1764	Acetolactate synthase large subunit IlvB1 1890816:1892552 reverse
Cp258_1798	Betaine aldehyde dehydrogenase 1929050:1930555 reverse
Cp258_1800	choline dehydrogenase 1932918:1934666 forward
Cp258_1859	Thiol-disulfide oxidoreductase resA 1992620:1993144 reverse
Cp258_1882	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2016862:2018583 reverse
Cp258_1909	Aldehyde dehydrogenase 2049663:2051183 reverse
Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
Cp258_2011	L-lactate dehydrogenase 2181376:2182326 reverse
Cp258_2012	Peptide methionine sulfoxide reductase 2182608:2183282 reverse
Cp258_2013	Manganese superoxide dismutase 2183625:2184227 forward
Cp258_2014	Flavin reductase 2184509:2185093 forward
Cp258_2044	Thioredoxin TrxA 2216427:2216795 reverse
Cp258_2062	hypothetical protein 2233858:2234526 forward
Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse
Cp258_2125	Thioredoxin reductase 2305214:2306161 forward
Cp258_2126	Thioredoxin 2306223:2306546 forward

---

**pathogenesis**

---

CDS	Annotation
Cp258_0031	phospholipase D 24664:25587 forward

---

**primary metabolic process**

---

CDS	Annotation
Cp258_0527	Ribosomal protein S30AE family protein 533286:533948 forward

---

**response to stress**

---

CDS	Annotation
Cp258_0952	Stress related protein 995335:995862 forward
Cp258_1393	Ribosome-associated heat shock protein/S4 1489718:1490092 reverse
Cp258_1912	Heat shock protein HspR 2053672:2054073 reverse
Cp258_1914	Molecular chaperone GrpE 2055443:2056087 reverse
Cp258_1915	Chaperone protein DnaK 2056084:2057916 reverse
Cp258_2034	Universal stress protein A 2202792:2203691 reverse
Cp258_2066	DNA protection during starvation protein 2236999:2237490 reverse