

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA PAULA CORRÊA ARGONDIZZO

Seleção e caracterização de candidatos proteicos para comporem uma vacina contra pneumococo a partir do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 5

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros
Prof. Dr. Ricardo Galler

RIO DE JANEIRO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS PARA A VERSÃO FINAL DA TESE (A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)

INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA PARA A DEFESA PÚBLICA DA TESE

C377r Argondizzo, Ana Paula Corrêa

Seleção e caracterização de candidatos proteicos para comporem uma vacina contra pneumococo a partir do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo

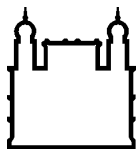
5./ Argondizzo, Ana Paula Corrêa. – Rio de Janeiro: 2013.

189 p.; il.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2013.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Proteínas recombinantes 3.
Vacinologia reversa 4. Bioinformática I.Título

CDD: 616.99419



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA PAULA CORRÊA ARGONDIZZO

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CANDIDATOS PROTEICOS PARA
COMPOREM UMA VACINA CONTRA PNEUMOCOCO A PARTIR DO GENOMA
DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SOROTIPO 5**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros
Prof. Dr. Ricardo Galler

Aprovada em: 16/12/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Leila de Mendonça Lima - **Presidente**
Prof. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite
Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente
Prof. Dra. Lucia Martins Teixeira
Prof. Dr. Antonio Basílio de Miranda

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2013.

Dedico este trabalho à todos aqueles que
contribuíram e contribuem para fazer deste um
mundo melhor.

Muito obrigada

Agradecimentos

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), à Coordenação do Curso de Biologia Celular e Molecular e ao Instituto de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz) pela oportunidade em realizar o curso de doutorado.

A Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) e a gerência do Programa de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos pela oportunidade de poder ter desenvolvido a função de gerente do projeto Vacina Pneumocócica Proteica no período 2010-2013. Obrigada por acreditarem no trabalho e em mim, certamente aprendi muito neste período, desenvolvendo minhas competências pessoais e profissionais.

Aos meus orientadores Dr. Marco Alberto Medeiros e Dr. Ricardo Galler pela confiança, oportunidade e por acreditarem no trabalho.

Aos meus pais, Carmen e Og (*in memorium*), pela formação, incentivo e amizade. Em especial a minha mãe, que apesar da distância e do tempo que nos separam, sempre esteve presente, acreditando em mim e auxiliando nos momentos mais difíceis. Mãe, sem você e sem o seu incentivo os momentos frustrantes desta caminhada seriam difíceis de serem ultrapassados. Ao meu pai que mesmo não estando presente para partilhar comigo mais esta vitória, teve a alegria de saber que a caminhada foi iniciada. Pai cheguei ao fim de mais esta etapa! Obrigada a vocês pelo carinho e amor incondicionais.

Aos meus irmãos Karla, Luciana e Eduardo pela amizade e incentivo, apesar da distância que nos separam, sempre estiveram presentes. Compartilho com vocês este momento de alegria!

Ao meu querido e amado Thiago, obrigada pelo amor, carinho, respeito, confiança e por ter compreendido as horas em que estive ausente. Agradeço a oportunidade de me ensinar a ver a vida de outra forma. Você é parte da melhor parte da minha vida! Sem você os momentos difíceis da caminhada talvez não conseguissem ser ultrapassados. Simplesmente te amo (bruguelo)!

Aos meus amigos pela amizade e carinho e por terem compreendido os momentos de ausência.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER)/Bio-Manguinhos pela amizade, companheirismo, confiança e compreensão dispensados nos momentos difíceis e angustiantes. Em especial a Cristiane, pelo imenso auxílio prestado nas etapas de sequenciamento e análise, a Carolina pela enorme ajuda com as planilhas e correção de inglês, ao Daniel pela ajuda com as densitometrias, a Fernanda pela ajuda com a purificação das proteínas, ao Claudio pela contribuição em diversas etapas do projeto. Sem o auxílio de vocês

o trabalho não teria sido concretizado. Aos demais colegas o meu muito obrigada pelo convívio e aprendizados diários, pelo carinho, respeito, empréstimo de materiais, enfim, por tudo!

À querida amiga, irmã e “mãe” Lulu (Maria Luiza Azevedo), um obrigada especial, sem palavras para agradecer o enorme carinho, amizade, compreensão, confiança, companheirismo e apoio. Você é um anjo. Muito obrigada pela correção do trabalho. Valeu!

Aos colegas que passaram pelo laboratório, e que deixaram um pouco si e levaram um pouco de mim. Obrigada por compartilharem momentos inesquecíveis. Muito obrigada a Marcos Gustavo e Camila Borges, pelo auxílio na purificação das proteínas, em especial à Camila pela ajuda nas etapas iniciais do trabalho. A Ariane, Karen, Guillermo, Julia, Juliana, Natália, Rafael e Mateus pela amizade, pelos momentos de alegria que passamos juntos e por compartilharem comigo parte desta jornada. Obrigada pelo apoio e incentivo que me ofereceram nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB)/Bio-Manguinhos, pela amizade e auxílios prestados ao longo do trabalho, muito obrigada pelos empréstimos de materiais e equipamentos. Obrigada especial à querida Denise Pereira, sempre presente e auxiliando na realização de experimentos, com muita simpatia e companheirismo. Obrigada à Dra. Ellen e a Dra. Maria de Lourdes Leal pelo fornecimento das amostras de pneumococos.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED)/Bio-Manguinhos pela amizade e auxílios prestados, em especial ao Michel e Alfredo pelo preparo das membranas de MAPIA. Obrigada muito especial a Marta e Roberto que nunca mediram esforços para realizar as aquisições e análises de citometria de fluxo.

Aos colegas do Núcleo de Lavagem e Esterilização (NULME)/Bio-Manguinhos pela amizade, carinho e preparo dos materiais utilizados no laboratório.

A todos os colegas dos demais laboratórios da Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico e a todos aqueles de Bio-Manguinhos que de alguma forma me auxiliaram.

A Plataforma de Microscopia/IOC e aos colegas Alanderson e Francisco, do Laboratório de Ultra-Estrutura Celular (LUC)/IOC, pelo imenso auxílio nas aquisições e análises de imunofluorescência. Muito obrigada pela ajuda prestada e pela simpatia com que sempre me acolheram.

A Dra. Leila Lima do Laboratório de Bioinformática e Genômica Funcional/IOC pelas avaliações, comentários, críticas e sugestões. Obrigada pela disponibilidade, auxílio e simpatia com que sempre me atendeu. Obrigada também à sua equipe de trabalho, em especial ao Leandro, que sempre me recebeu muito bem.

Aos colegas Dra. Juliana Meis e Dr. Ingo Rieder, do Laboratório de Pesquisa sobre o

Timo/IOC, pela ajuda nas etapas iniciais de citometria de fluxo e imunofluorescência. Obrigada por sempre me atenderem com muita simpatia e carinho.

Aos colegas Dr. Antonio Miranda e Dr. Fabio Mota, do Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas/IOC, pela colaboração. Obrigada especial ao Fabio pelo enorme auxílio prestado na realização do trabalho, não tenho palavras para agradecer as inúmeras vezes em que me atendeu, sempre muito simpático, alegre e confiante, não medindo esforços para sanar minhas dúvidas.

A Dra. Joice Reis, da Universidade Federal da Bahia e pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM)/Fiocruz, pelo fornecimento dos soros de pacientes e das amostras clínicas de pneumococos.

Ao Dr. Bruno Sobral, do Instituto de Bioinformática da Virgínia (VBI)/EUA pela colaboração e sequenciamento do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 5 cepa 617/00 e ao Dr. Jeronimo Ruiz, pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz pelas análises iniciais do genoma sequenciado.

Aos funcionários do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz pelo fornecimento dos animais, de sangue e derivados.

Aos colegas do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN)/Bio-Manguinhos nas pessoas de Isabel e Plínio, veterinários responsáveis pelo acompanhamento dos experimentos. Obrigada especial a todos os técnicos que realizaram os experimentos, sem vocês parte do trabalho realizado não seria possível. Muito obrigada também ao ex-colega Luis Cezar pela enorme ajuda prestada na escrita e revisão do CEUA.

Aos funcionários da limpeza e manutenção pela organização do ambiente de trabalho.

Ao PAPES V e VI/Fiocruz e a Bio-Manguinhos pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Aos professores e mestres pelos ensinamentos e a todos aqueles que compartilharam comigo dos mais diversos momentos, incentivando-me e orientando-me e que, direta ou indiretamente, permitiram e/ou participaram na realização do trabalho.

A todos vocês eu dedico um pouco desta vitória! Obrigada por partilharem comigo a realização de mais este sonho!

Muito obrigada

" Aquele que conhece os outros é sábio.
Aquele que conhece a si mesmo é iluminado.

Aquele que vence os outros é forte.
Aquele que vence a si mesmo é poderoso.

Aquele que conhece a alegria é rico.
Aquele que conserva o seu caminho tem
vontade.

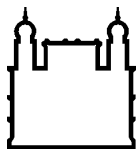
Seja humilde, e permanecerás íntegro.
Curva-te, e permanecerás ereto.

Esvazia-te, e permanecerás repleto.
Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exhibe, e por isso brilha.
O sábio não se faz notar, e por isso é notado.

O sábio não se elogia, e por isso tem mérito.
E, porque não está competindo,
ninguém no mundo pode competir com ele."

Lao-Tsé



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

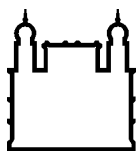
SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CANDIDATOS PROTEICOS PARA COMPOREM UMA VACINA CONTRA PNEUMOCOCO A PARTIR DO GENOMA DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SOROTIPO 5

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Ana Paula Corrêa Argondizzo

Streptococcus pneumoniae é um patógeno colonizador da nasofaringe de humanos sendo responsável pela maioria das pneumonias adquiridas na comunidade, além de causar diversas doenças não-invasivas e invasivas. As vacinas disponíveis atualmente são sorotipo específicas, além disso as conjugadas apresentam limitado espectro de ação e alto custo de produção, ao passo que as polissacarídicas apresentam baixa imunogenicidade em crianças menores de dois anos de idade e adultos maiores de 65 anos, grupos os quais se encontram em alto risco de adquirirem doenças pneumocócicas. Assim, a utilização de proteínas recombinantes, associadas à virulência, é uma alternativa para a composição de vacinas. Neste trabalho, empregando a vacinologia reversa, selecionamos 20 genes que codificam proteínas com predição para localização na superfície celular. Dentre os candidatos selecionados amplificamos, clonamos e expressamos 19 genes e purificamos 10 proteínas recombinantes na forma solúvel. A expressão e localização das proteínas na superfície dos pneumococos foram confirmadas por meio de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta. Além disso, observamos que 4 das 10 proteínas de pneumococos foram capazes de interagir com proteínas de matriz extracelular, embora os anticorpos policlonais gerados contra as proteínas recombinantes não tenham sido capazes de inibir a adesão da bactéria às células eucarióticas A549. A antigenicidade das proteínas recombinantes de pneumococo foi avaliada frente a soros de pacientes com meningite pneumocócica e observamos que duas proteínas foram reconhecidas por mais de 50% dos soros avaliados. A presença e o grau de identidade dos genes selecionados em amostras de pneumococos de origem clínica foram avaliados por PCR e sequenciamento. Verificamos que a maioria dos genes está presente nas 51 amostras utilizadas neste estudo e demonstraram um alto grau de conservação nucleotídico e proteico entre as amostras de pneumococos, bem como em *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* e *S. oralis*, espécies que são altamente relacionadas geneticamente com os pneumococos. Assim, propomos que as proteínas 02232 (CbpE), 00080 (proteína ligadora de ATP/ABC transportadora), 00333 (componente permeásico/proteína ABC transportadora) e 01065 (histidina quinase) podem ser consideradas importantes alvos vacinais por serem expressas e expostas à superfície bacteriana e terem demonstrado interação com proteínas de matriz extracelular, podendo indicar algum papel destas proteínas no processo de adesão da bactéria às células do hospedeiro. Por outro lado não descartamos a possível importância das proteínas 02072 (PiuA) e 02009 (proteína hipotética) no processo de infecção de pneumococo, em virtude de essas proteínas terem sido reconhecidas por mais de 41% dos soros de pacientes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEINS CANDIDATES TO COMPOSE A PNEUMOCOCCAL VACCINE FROM THE GENOME OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPE 5

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Ana Paula Corrêa Argondizzo

Streptococcus pneumoniae is a colonizer of the human nasopharynx, which accounts for most of the community-acquired pneumonia cases and can cause non-invasive and invasive diseases. Currently available vaccines are serotype-specific; conjugate vaccines show a limited spectrum of action and high production costs, while the polysaccharide vaccine have low immunogenicity in children under two years of age and adults over 65, groups which are at high risk of acquiring pneumococcal disease. To overcome these problems, the use of recombinant proteins, associated with virulence, is an alternative to compose vaccines. In this work, 20 proteins with positive prediction for extracellular localization were selected by reverse vaccinology. A total of 19 genes were amplified, cloned and expressed. Ten proteins were purified in a soluble form. The expression of the selected proteins on the pneumococci cell surface was confirmed by flow cytometry and immunofluorescence. Data showed that 4 proteins were able to interact with extracellular matrix proteins. However, polyclonal antibodies against the recombinant proteins were not able to inhibit the pneumococci adhesion to A549 eukaryotic cells. The protein antigenicity was evaluated by immunoblotting using antisera from patients with pneumococci meningitis and two proteins were recognized in more than 50% of the serum samples. In order to evaluate the identity degree of the selected genes, PCR assays were carried out. Most of the genes were present in all clinical isolates and showed a high degree of nucleotide and amino acid conservation between pneumococci samples, as well as in *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis* species. Thus, we propose that proteins 02232 (CbpE), 00080 (ABC transporter, ATP-binding protein), 00333 (ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component) and 01065 (sensor histidine kinase, putative) can be considered important vaccine targets since they were expressed and exposed to the bacterial surface and demonstrate interaction with extracellular matrix proteins, which may indicate a role of these proteins in the process of adhesion of the bacteria to host cells. However, proteins 02072 (PiuA) and 02009 (hypothetical protein) should also be considered for they were recognized by over 41% of sera from patients and could be important in the pneumococcal infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura do <i>S. pneumoniae</i>	1
Figura 1.4.1: Esquema de fatores de virulências em <i>S. pneumoniae</i>	7
Figura 4.7.1: Vetor de expressão pET100/D-TOPO.....	26
Figura 5.3.1: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Phobius”.....	43
Figura 5.3.2: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “SignalP 3.0 Server”.....	44
Figura 5.3.3: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “SOSUISignal”.....	45
Figura 5.3.4: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “TMHMM Server v.2.0”.....	46
Figura 5.3.5: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Pred-Lipo”.....	47
Figura 5.3.6: Avaliação das proteínas 00062, 00265 e 00063 utilizando o programa “Phobius”.....	49
Figura 5.4.1: Análise, por eletroforese em gel de agarose 1%, dos produtos de PCR dos fragmentos gênicos de pneumococos.....	54
Figura 5.5.1: Análise, por eletroforese em gel de agarose 1%, dos produtos de PCR dos fragmentos gênicos de pneumococos - clones recombinantes.....	55
Figura 5.6.1: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% da expressão das proteínas recombinantes.....	57
Figura 5.6.2: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% ou 15%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00271, 00333, 01909, 01195, 01065, 00589 e 00787.....	60
Figura 5.6.3: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00080, 02265, 02277, 02232 e 01967.....	61
Figura 5.6.4: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% ou 15%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00265, 00397, 00062, 00962, 02009, 01929 e 02072.....	62
Figura 5.7.1: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 00333.....	64
Figura 5.8.1.1: Titulação dos anticorpos policlonais, produzidos em camundongos, pela técnica de “dot blot”, utilizando sistema revelador baseado em fosfatase alcalina.....	65
Figura 5.8.1.2: Titulação dos anticorpos policlonais, produzidos em camundongos, pela técnica de “western blot”, utilizando sistema revelador baseado em fosfatase	

alcalina.....	67
Figura 5.8.2.1.: Antigenicidade das proteínas recombinantes de pneumococos em relação aos soros de pacientes diagnosticados com meningite pneumocócica - avaliação por MAPIA.....	68
Figura 5.9.1: Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas 02072, 00265, 01929, 01065, 02232, 00080, 00333, 00962, 01909 e 02009 na superfície de pneumococos.....	72
Figura 5.9.2: Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteína PsaA e 02072 na superfície de pneumococos e <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813.....	73
Figura 5.9.3: Percentual de células pneumocócicas expressando as proteínas 02072, 00265, 01929, 01065, 02232, 00080, 00333, 00962, 01909 e 02009 na superfície de pneumococos.....	74
Figura 5.10.1: Imunofluorescência indireta para estudo da expressão de proteínas de superfície de pneumococos.....	80
Figura 5.11.1: Avaliação do MOI para infecção das células A549 com <i>S. pneumoniae</i> 5 617/00.....	81
Figura 5.11.2: Índice médio de fluorescência obtido a partir da análise de citometria de fluxo para estudo da inibição da adesão de pneumococos às células A549 utilizando anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes de pneumococos.....	82
Figura 5.12.1: Avaliação da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.6.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento gênicos de pneumococos.....	24
Tabela 4.6.2: Temperaturas de anelamento testadas nas reações de PCR.....	25
Tabela 4.11.1: Metodologia empregada na purificação das proteínas solúveis.....	31
Tabela 5.1.1: Descrição das características: tamanho do genoma, número de genes e de proteínas anotadas e conteúdo de GC para amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em comparação com o sorotipo 5 cepa 617/00.....	40
Tabela 5.3.1: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Psortb v3.0.2”.....	47
Tabela 5.4.1: Tamanho original dos genes e dos fragmentos gênicos clonados e retirados, percentual do tamanho dos fragmentos gênicos retirados, tamanho das proteínas expressas/purificadas e descrição da região retirada da proteína (região gênica não amplificada).....	53
Tabela 5.6.1: Solubilidade das proteínas recombinantes expressas em <i>Escherichia coli</i> Star BL21 (DE3).....	63
Tabela 5.13.1: Presença e grau de conservação dos alvos em amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus mitis</i> B6, <i>Streptococcus oralis</i> Uo5 e <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> IS7493.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
"blastn"	"basic local alignment search tool for nucleotide"
"blastp"	"basic local alignment search tool for protein"
"overlap"	sobreposição
"query"	sequência de entrada
<	menor do que
>	maior do que
°X	graus Celcius
aa	aminoácido
Abs	absorbância
ARN	ácido ribonucleico
BCA	ácido bicinchonínico
BSA	albumina bovina
CBP	proteína ligadora de colina
CbpA	"choline binding protein A"
CbpC	"choline binding protein C"
CbpD	"choline binding protein D" - mureína hidrolase
CbpE	"choline binding protein E"
CEUA	Comissão de Ética de Animais
ClpP	serino protease
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
CPS	cápsula polissacarídica
CRM ₁₉₇	toxina diftérica mutante não tóxica
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
fHbp	proteína ligadora de fator H
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	isocianato de fluoresceína
FPLC	fast performance liquid chromatography
GenBank	base de dados de sequências genéticas
GLIMMER	"Gene Locator and Interpolated Markov Model"

GSK	“GlaxoSmithKline Biologicals”
h	hora
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HGT	transferência gênica horizontal
Hic	"factor-H binding inhibitor of complement"
HSP	"high score segment pair"
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IMAC	cromatografia de afinidade utilizando íon metálico imobilizado
IMF	índice médio de fluorescência
IPD	doença pneumocócica invasiva (“invasive pneumococci disease”)
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LB	Luria Bertani
LicC	fosfocolina citidiltransferase (“phosphocholine citidyltransferase”)
LytA	N-acetilmuramoil-L-alanina amidase (“N-acetylmuramoyl-L-alanine”)
M	molaridade
MAPIA	"multi-antigen print immunoassay"
MEM	"minimum essential medium"
μg	micrograma
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
μL	microlitro
MLST	"multilocus sequence typing"
mM	milimolar
μmol	micromolaridade
MOI	multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
MUSCLE	"MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation"
N	normalidade
Nan (A e B)	neuraminidase (A e B)
Ng	nanograma
nm	nanômetro
nmol	nanomolaridade

OMS	Organização Mundial da Saúde
PavA e B	“pneumococcal adherence and virulence factor A e B”
pb	par de base
PBP	proteína ligadora de penicilina
Pbp3	“D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase”
PBS	tampão salina fosfato
PBSB	tampão salina fosfato acrescida de 3% de BSA
PBST	tampão salina fosfato acrescido de 0,05% tween 20
PBSTB	tampão salina fosfato acrescido de 0,05% tween 20 e BSA 0,25%
PcpA	"pneumococcal choline-binding protein A"
PCR	"polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)
PcsB	“protein required for cell wall separation of group B <i>Streptococcus</i> ”
PCV10	vacina conjugada 10 valente
PCV13	vacina conjugada 13 valente
PCV15	vacina conjugada 15 valente
PCV7	vacina conjugada 7 valente
PfbA	"plasmin- and fibronectin-binding protein"
PgdA	"peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase"
pH	potencial hidrogeniônico
PiaA	"pneumococcal iron acquisition"
PiuA	“pneumococcal iron uptake”
Ply	pneumolisina
PMSF	"phenylmethylsulfonyl fluoride"
PNPS	pneumococos não sensíveis à penicilina
PotD	"polyamine transport protein D"
PpmA	"putative proteinase maturation protein A"
PppA	"pneumococcal protective protein A"
PS	polissacarídeos capsulares
PsaA	"pneumococcal surface adhesin A"
PspA	"pneumococcal surface protein A"
RrgA, B e C	proteínas componentes do pili bacteriano
seg	segundo
sIgA	imunoglobulina A secretora
SIREVA	Sistemas de Redes de Vigilância dos agentes responsáveis por Pneumonias e Meningites Bacterianas

SPN 5 617/00	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 5 cepa 617/00
SpsA	" <i>S. pneumoniae</i> secretory IgA binding protein"
StkP	"serine/threonine protein kinase"
StrA	sortase A
TAE	tampão tris base/ácido acético glacial/EDTA
TB	"Terrific Broth"
THB	"Todd Hewitt broth"
THE	THB suplementado com 1% de extrato de levedura
TMX/SMP	trimetoprim/sulfametoxazol
TSA	"Tryptic Soy Agar" (agar soja triptona; agar casoy; caso agar)
U	unidade
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
v/v	volume a volume
VBI	Instituto de Bioinformática da Virgínia ("Virginia Bioinformatic Institute")
VC	volume de coluna
WGS	"Whole Genome Shotgun" (genomas sequenciados porém não fechados)
xg	força centrífuga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características da bactéria <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2. Patogênese.....	1
1.3. Epidemiologia e resistência aos antimicrobianos.....	2
1.4. Fatores de virulência.....	6
1.4.1. Cápsula.....	7
1.4.2. Parede celular.....	8
1.4.3. Proteínas consideradas potenciais candidatos vacinais.....	8
1.5. Vacinas.....	11
1.6. Vacinologia reversa.....	16
1.7. <i>Escherichia coli</i> como sistema de produção de proteínas recombinantes.....	17
2.JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Sequenciamento e anotação do genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 5 cepa 617/00.....	21
4.2. Montagem dos bancos de dados.....	21
4.3. Seleção das proteínas presentes em pneumococos.....	22
4.4. Análises “in silico”.....	22
4.5. Cultivos bacterianos.....	22
4.6. Amplificação dos genes de pneumococos por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
4.7. Clonagem dos genes de pneumococos.....	26
4.8. Seleção e confirmação dos clones recombinantes em <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	27
4.9. Sequenciamento nucleotídico.....	28
4.10. Expressão e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> BL21 Star (DE3).....	28
4.11. Purificação das proteínas recombinantes.....	30
4.12. Preparo dos antígenos para a produção dos anticorpos policlonais em animais.....	31

4.13. “Immunoblotting”.....	32
4.14. Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos.....	33
4.15. Imunofluorescência indireta para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos.....	35
4.16. Ensaio de adesão e inibição da adesão celular.....	36
4.17. ELISA para estudo da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular.....	37
4.18. Avaliação do grau de identidade nucleotídica e proteica entre amostras de pneumococos isolados no Brasil e análises filogenéticas.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Sequenciamento e anotação do genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipo 5 cepa 617/00.....	40
5.2 Montagem dos bancos de dados.....	41
5.3. Análises “in silico” e seleção das proteínas.....	42
5.4. Amplificação dos genes por PCR.....	52
5.5. Clonagem dos genes de pneumococos, obtenção dos clones recombinantes e sequenciamento.....	54
5.6. Expressão e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> BL21 Star (DE3).....	56
5.7. Purificação das proteínas recombinantes.....	63
5.8. “Immunoblotting”.....	64
5.8.1 Titulação dos anticorpos policlonais produzidos em camundongos....	64
5.8.2. Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes em relação ao soro de pacientes.....	68
5.9. Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos.....	71
5.10. Imunofluorescência indireta para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos.....	79
5.11. Ensaio de adesão e inibição da adesão celular.....	81
5.12. ELISA para estudo da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular.....	85
5.13. Avaliação da presença e do grau de identidade gênica e nucleotídica entre amostras de origem clínica de pneumococos.....	89
5.14. Análises filogenéticas.....	94

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
8. ANEXOS.....	117
Anexo 1: Genomas utilizados, número de proteínas anotadas, estatus dos sequenciamentos, características das cepas, publicações e centros que realizaram o sequenciamento dos genomas utilizados para a montagem dos bancos de dados.....	117
Anexo 2: Meios de cultura.....	120
Anexo 3: Soluções.....	121
Anexo 4: Características e fonte/referência das espécies de <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste trabalho.....	125
Anexo 5: Amostras de pneumococos.....	126
Anexo 6: Gel de SDS-PAGE utilizado para realização da densitometria (verificar pureza proteica).....	128
Anexo 7: Licença CEUA.....	129
Anexo 8: Proteínas ortólogas encontradas em pneumococos.....	130
Anexo 9: Programas utilizados para análises “in silico” das proteínas pneumocócicas e número de proteínas classificadas dentro de cada característica avaliada pelos programas.....	159
Anexo 10: Análises “in silico” das 159 proteínas ortólogas presentes em pneumococos.....	160
Anexo 11: Purificação das proteínas recombinantes pneumocócicas: 01909, 00265, 01065, 00080, 00962, 02009, 01929, 02072, 02232, 02277, 01967, 00589, 00787, 00397, 01195, 02265, 00271 e 00062.....	164
Anexo 12: Presença dos genes em amostras de <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> e <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	173
Anexo 13: Árvores filogenéticas.....	175
Anexo 14: Padrões de tamanho e peso molecular.....	189

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características da bactéria *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, referido como pneumococo, é uma bactéria da ordem Lactobacillales e família Streptococcaceae, apresentando-se na forma de cocos de 0,5 a 1,25 µm de diâmetro, gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase negativos, solúveis em bile e sensíveis a optoquina, encapsulados, e que se dispõem aos pares ou em curtas cadeias. Em meio de agar sangue as colônias são alfa hemolíticas e apresentam halo de hemólise de cor esverdeada, o que caracteriza a destruição parcial dos eritrócitos no meio de cultura (Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008) ¹. Na superfície da bactéria podem ser identificadas três estruturas principais: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula polissacarídica (CPS) que é a camada mais externa e espessa (Figura 1.1.1). Uma característica importante para destacar sobre a parede celular é sua composição, sendo formada por camadas de peptidoglicanos onde estão ancorados os polissacarídeos da parede celular, os polissacarídeos capsulares (PS) e outras proteínas. Embora os polissacarídeos da parede celular sejam comuns a todos os sorotipos de pneumococos, a estrutura química dos polissacarídeos capsulares é específica do sorotipo (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995) ².

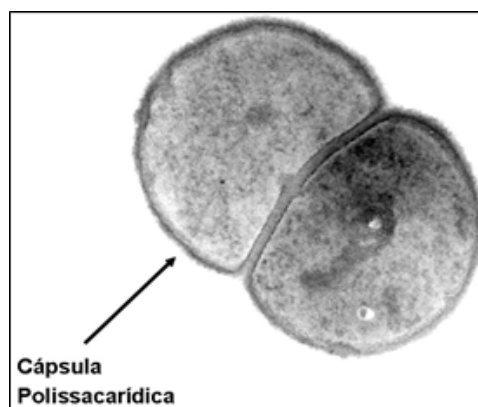


Figura 1.1.1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura do *S. pneumoniae*. O microrganismo está formando um diplococo. O contorno do microrganismo, de tom mais escuro, é a cápsula polissacarídica, camada mais densa. Fonte: Pletz *et al.*, 2008 ³.

1.2 Patogênese

S. pneumoniae é uma bactéria comensal que coloniza assintomaticamente a nasofaringe de humanos, principalmente de crianças jovens (40-60%) que são os principais reservatórios desta espécie, comparados com crianças mais velhas (12%), adolescentes (6-10%) e adultos (3-4%) (García-Suárez *et al.*, 2006; Mehr & Wood, 2012; Varon, 2012) ^{4; 5; 6}. A transmissão do microrganismo se dá por meio de gotículas respiratórias, e há estudo indicando que a transmissão em adultos jovens pode ocorrer por meio da saliva (Levine *et al.*, 2012) ⁷.

O pneumococo pode causar diferentes formas clínicas de doença - não invasivas como otite média, especialmente em crianças, sinusite, conjuntivite, bronquite e pneumonia, e invasivas como bacteremia, pneumonia bacterêmica, meningite, sepse, peritonite e artrite/osteomielite. A bactéria pode se espalhar a partir da nasofaringe ou orofaringe para a corrente sanguínea, causando bacteremia, e infectar outros sítios, como as meninges, causando meningite. As doenças causadas pela invasão da bactéria na corrente sanguínea e infecção posterior de outros sítios são coletivamente referidas como doença pneumocócica invasiva (IPD). Os pneumococos podem também ser aspirados a partir da naso ou orofaringe para o pulmão, resultando em pneumonia, ou podem se espalhar para outros sítios adjacentes como o ouvido médio, causando otite média, ou para os seios nasais, causando sinusite. As formas mais comuns e graves da doença pneumocócica são a pneumonia e a meningite, sendo que esta quando não fatal pode deixar sequelas irreversíveis nos pacientes sobreviventes. As infecções menos graves, como otite média, sinusite e bronquite são mais comuns do que a pneumonia ou meningite, mas geralmente não são fatais (WHO, 2013) ⁸.

A colonização pneumocócica é um processo dinâmico e a aquisição do mesmo sorotipo é relativamente comum (Mehr & Wood, 2012) ⁵. O sistema imune inato e adaptativo geralmente impede a colonização de progredir para a doença, no entanto alterações da homeostase patógeno-hospedeiro estão associadas com risco de vida e IPD (García-Suárez *et al.*, 2006) ⁴.

1.3 Epidemiologia e resistência aos antimicrobianos

Das cerca de 8,8 milhões de mortes anuais globais entre crianças <5 anos de idade, em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 476.000 foram causadas por pneumococo, sendo as taxas de mortalidade mais altas nos países em desenvolvimento do que nos países industrializados. Estima-se que a incidência de pneumonia em crianças <5 anos de idade seja de 0,29 casos/ano nos países em desenvolvimento e 0,05 casos/ano em países desenvolvidos. Isso se traduz em aproximadamente 156 milhões de novos casos cada ano no mundo inteiro, onde 151 milhões acontecem nos países em desenvolvimento (OMS, 2010) ⁹. A maioria das mortes ocorrem na África e na Ásia, sendo que as crianças imunossuprimidas pelo vírus da imunodeficiência humana apresentam risco aumentado de apresentarem doença grave causada por pneumococo (O'Brien *et al.*, 2009) ¹⁰.

Como descrito no item 1.2 os pneumococos podem causar doenças não invasivas e invasivas, resultando em taxas significantes de mortalidade e morbidade no mundo (Bogaert *et al.*, 2004; Castanheira *et al.*, 2004; Bricks & Berezin, 2006; O'Brien *et al.*, 2009) ^{10; 11; 12; 13}. No Brasil a maior taxa de incidência de meningite pneumocócica têm sido registrada em

recém-nascidos e crianças <1 ano de idade (Bricks & Berezin, 2006)^{13; 14; 15}. Dados de 2012 do projeto SIREVA (Sistemas de Redes de Vigilância dos agentes responsáveis por Pneumonias e Meningites Bacterianas) indicam que entre as 197 amostras de isolados invasivos de pneumococos isolados no Brasil em crianças <5 anos de idade, 46,2% foram responsáveis por causar meningite, 27,9% sepse/bacterêmica e 25,3% pneumonia (Informe Regional SIREVA II, 2012)¹⁶.

Essa bactéria é responsável pela maioria dos casos de pneumonias adquiridas nas comunidades e, entre as síndromes clínicas associadas às infecções pneumocócicas, a pneumonia é a de maior importância em relação à morbidade e à mortalidade total (O'Brien *et al.*, 2009; Mehr & Wood, 2012; Varon, 2012)^{5; 6; 10}.

Assim, as infecções pneumocócicas continuam sendo altamente prevalentes em todas as regiões do mundo, tornando-se uma prioridade de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (García-Suárez *et al.*, 2006; OMS, 2010)^{4; 9}.

Em relação às mortes por infecções pneumocócicas, a OMS (OMS, 2010)⁹ estima que, das 10 milhões de mortes anuais no mundo, em crianças <5 anos de idade, mais de 1,9 milhões sejam devido às infecções por essa bactéria, mais que qualquer outra doença. Isso representa 19% de todas as mortes de <5 anos de idade, sem incluir os óbitos por pneumonia durante as primeiras quatro semanas de vida. Incluindo esses óbitos, a pneumonia seria responsável por até três milhões (29%) das mortes anuais em <5 anos de idade.

Embora as taxas de mortalidade causada por infecções pneumocócicas ainda seja elevada, essas taxas sofreram grande declínio após a introdução das sulfonamidas e da penicilina, entre os anos 30 e 40 do século passado (Dowell apud Nascimento-Carvalho, 2003)¹⁷. As primeiras cepas de pneumococo resistentes às sulfonamidas foram relatadas já em 1943 (Tillett apud Nascimento-Carvalho, 2003)¹⁷. Em 1965 foi descrita, pela primeira vez, a ocorrência de cepa de *S. pneumoniae* resistente à penicilina (Appelbaum apud Nascimento-Carvalho, 2003)¹⁷. Desde então, particularmente nos últimos dez anos, tem sido cada vez mais freqüente, em diversas partes do mundo, o relato de casos de infecção causada por pneumococo com suscetibilidade diminuída, ou até mesmo totalmente resistente à penicilina e/ou a outros antimicrobianos, incluindo tetraciclina, trimetoprim+sulfametoxazol (TMX/SMP), cloranfenicol, eritromicina e cefalosporinas (Alvares *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2001; Nascimento-Carvalho *et al.*, 2003; Castanheira *et al.*, 2004)^{12; 17; 18; 19}.

A resistência dessas bactérias aos antibióticos é frequentemente devido a modificação de genes alvos: mosaico das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) associado a menor afinidade aos betalactâmicos, metilação do ADN (ácido desoxirribonucleico) que codifica

para o ARN (ácido ribonucleico) ribossomal 23S, que leva a resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas B, efluxo do antibiótico associado com a expressão do gene *mefE* (resistência somente aos macrolídeos) e mutações em topoisomerases ParC/E ou GyrA para fluoroquinolonas (Castanheira *et al.*, 2004; Varon, 2012) ^{6; 12}.

O surgimento e disseminação mundial de resistência à penicilina entre cepas de pneumococos representa um problema importante no tratamento de infecções do trato respiratório, principalmente pneumonias. Infecções causadas por cepas não sensíveis à penicilina (PNPS) são associadas com idade e prévio uso de antibióticos e podem ser tratadas por via intravenosa com cefalosporinas de terceira geração (no caso de meningite pneumocócica); no entanto, existem muito poucas opções disponíveis para o tratamento de infecções, especialmente meningite causada por cepas resistentes as cefalosporinas de terceira geração (Castanheira *et al.*, 2004) ¹².

Doenças causadas por PNPS têm repercussões significativas em países em desenvolvimento, onde os fatores associados com a pobreza contribuem para a elevação das taxas de risco de vida associadas as doenças pneumocócicas como a meningite. Brandileone *et al.* (2006) ²⁰ demonstraram que, no período de 1993 a 2004, a ocorrência de cepas de pneumococos resistentes a penicilina aumentou no Brasil, indo de 10,2% para 27,9%.

Em relação a epidemiologia e distribuição das cepas de pneumococos, embora todos os sorotipos possam causar qualquer manifestação clínica das doenças pneumocócicas, alguns sorotipos são mais frequentemente associados com certas apresentações da doença. Diversos estudos têm sido publicados demonstrando a distribuição dos sorotipos de pneumococos em IPD e na colonização (presentes na nasofaringe), associando a distribuição com a idade, sexo e área geográfica (Scott *et al.*, 1996; Kyaw *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Hausdorff *et al.*, 2005; Varon, 2012) ^{6; 21; 22; 23; 24}. Por exemplo, os membros dos sorotipos 6, 10 e 23 são consistentemente isolados com mais frequência a partir de líquido cefalorraquidiano do que de sangue em crianças e adultos, ao passo que o inverso é verdadeiro para os sorotipos 1, 4 e 14. Infelizmente, as variáveis tais como a idade precisa, as taxas de hospitalização e resistência a antibióticos são frequentemente associados um com o outro, bem como com o sorotipo, tornando difícil separar a contribuição exata de cada um (Hausdorff *et al.*, 2005) ²⁴. Os sorotipos mais prevalentes associados a nasofaringe (por exemplo, 19 e 23) são relativamente mais comuns na Europa e na América do Norte, enquanto que sorotipos invasivos como 1 e 5 são mais comuns na América do Sul. O risco relativo de doença com o sorotipo 1 diminui regularmente ao longo da vida, enquanto que com os sorotipos 3 e 8 aumenta ao longo da meia-idade. Os sorotipos 7 e 23 são frequentemente encontrados na

terceira década de vida (Scott *et al.*, 1996) ²¹.

No período de 2000 a 2008, no Brasil, os sorotipos mais frequentes associados às IPD foram: 14 (27,9%), 6B (9,7%), 19F (5,4%), 23F (5,4%), 18C (5,1%), 3 (4,5%), 6A (4,3%), 1 (3,8%), 5 (3,5%), 19A (3,3%), 9V (3,2%), 4 (2,8%), 7F (2,1%) e outros (19,1%). Pode-se perceber que os sorotipos mais importantes (14, 6B, 19F e 23F) foram os responsáveis por quase 50% de todas as infecções (Ministério da Saúde, 2010; Informe Regional SIREVA II, 2012) ^{25; 26} similar ao observado no estudo de Gray *et al.* (1979) ²⁷. A experiência clínica mundial mostra que são poucos os sorotipos com maior impacto clínico; doze sorotipos (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 18, 19 e 23) são os responsáveis por mais de 80% das infecções pneumocócicas invasivas (Hausdorff *et al.*, 2005) ²⁴.

Estudos realizados no Brasil por Ko *et al.* (2000), Berezin *et al.* (2002), Mantese *et al.* (2003) e Alvares *et al.* (2011) ^{18; 28; 29; 30} identificaram que os sorotipos 1, 5, 6A, 6B, 14, 18C, 19A e 23F foram os principais isolados em pacientes com meningite pneumocócica, sendo que os sorotipos 1 e 5 foram relatados como sendo altamente prevalentes em isolados de fluidos corpóreos de pacientes com IPD em países em desenvolvimento, principalmente nos países da América do Sul (Sessegolo *et al.*, 1994; Castañeda *et al.*, 1997; Hortal *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1997) ^{31; 32; 33; 34}.

Estudos de colonização por pneumococos (Lucarevski *et al.*, 2003; Laval *et al.*, 2006) ^{35; 36} verificaram que os sorotipos 6A, 6B, 10A, 14, 18C, 19F e 23F foram os mais comumente isolados, sendo os sorotipos 14 e 23F os que mais frequentemente apresentam resistência a mais de um antibiótico (cepas multirresistentes). Nestes estudos os sorotipos 1 e 5 foram raramente isolados da nasofaringe. A hipótese proposta é de que por causa da sua virulência, os sorotipos 1 e 5 têm passagem transiente e rápida na nasofaringe antes de alcançar o sangue (Brueggemann *et al.*, 2003 e 2004) ^{37; 38}.

Na literatura temos diversos trabalhos relatando a importância do sorotipo 5 causando doença pneumocócica em países menos desenvolvidos, como os da América do Sul. Assim, com base nestas informações e em dados de pesquisas epidemiológicas realizadas no Brasil, e tendo em vista que quando iniciou-se este trabalho a vacina PCV7 (vacina conjugada 7 valente) não contemplava a presença deste sorotipo, em nosso estudo propomos então selecionar possíveis candidatos proteicos a partir da análise do genomas do sorotipo 5, cepa 617/00, a qual foi isolada no Instituto Adolfo Lutz (IAL)/Brasil/São Paulo de um paciente com meningite.

Dados do projeto SIREVA dos anos de 2009 a 2012 demonstraram que o sorotipo 5 de pneumococo foi isolado em 1,4%, 1,1%, 0,9% e 0,5%, respectivamente, das amostras analisadas (Informe Regional SIREVA II, 2009, 2010, 2011 e 2012) ^{39; 40; 41; 26}. A seguir

citamos alguns trabalhos epidemiológicos realizados no Brasil e que demonstram a importância do sorotipo 5 nas doenças pneumocócicas. Sessegolo *et al.* (1994)³⁴, demonstraram em seu estudo que o sorotipo 5 foi o quarto sorotipo mais isolado no Brasil no período de 1988 a 1992. Os sítios de isolamento de pneumococos incluíram: sangue, secreção do trato respiratório, fluido cefalorraquiadano, secreções oculares ou outras secreções e fluídos corpóreos.

Brandileone *et al.* (1995)⁴², verificaram que no período de 1977 a 1992, na grande São Paulo/Brasil, o sorotipo 5 foi o sétimo maior agente causador de doenças pneumocócicas invasivas (meningite), sendo identificado em 5% dos isolados (74 amostras das 1477 analisadas).

Nascimento-Carvalho *et al.* (2003)¹⁷ demonstraram que o sorotipo 5 de pneumococo foi o segundo maior agente causador de doenças invasivas, no período 1997 a 2002 em Salvador/Bahia, perdendo apenas para o sorotipo 14. Neste estudo o sorotipo 5 foi isolado em 10% dos casos (7 amostras das 70 analisadas).

Mantese *et al.* (2009)⁴³, demonstraram que no período de 1999 a 2003 o sorotipo 5 foi isolado em 10,3% dos casos de doença invasiva (10 dos 101 isolados) e no período de 2004 a 2008 foi isolado em 11,1% dos casos (5 dos 41 isolados), em crianças <5 anos de idade atendidas no Hospital Universitário em Uberlândia/Minas Gerais.

1.4 Fatores de virulência

Os principais fatores de virulência de pneumococo incluem a CPS, a parede celular e proteínas diversas localizadas na superfície da célula ou no citoplasma. Essas estruturas celulares são conhecidas como fatores de virulência, pois elas são essenciais para os processos de aderência, colonização e invasão por parte do microrganismo. Além disso, estes fatores de virulência têm a capacidade de produzir resposta inflamatória no hospedeiro (Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008)¹. Algumas dessas estruturas e proteínas estão representadas na Figura 1.4.1.

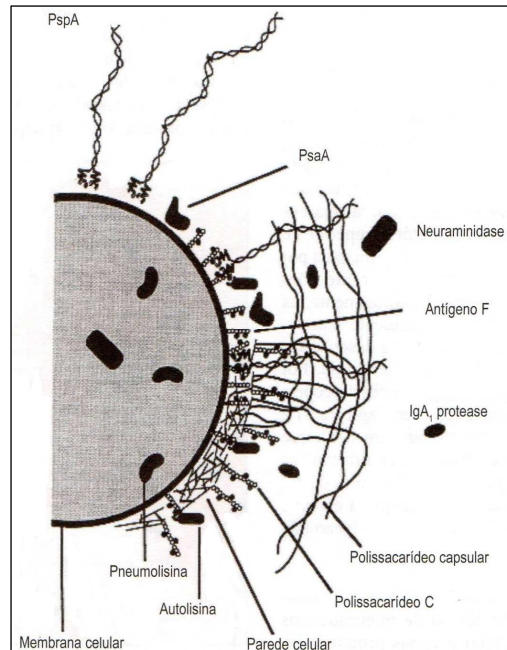


Figura 1.4.1: Esquema de fatores de virulências em *S. pneumoniae*. Fonte: Teixeira, Merquior e Trabulsi *in* Trabulsi e Althertun, 2008, p. 202 ¹.

1.4.1 Cápsula

A camada mais externa dos pneumococos é formada pela CPS que é um polímero de alto peso molecular composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas e possui em torno de 200 a 400 nm de espessura (Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008; Kadioglu *et al.*, 2008) ¹; ⁴⁴. A CPS é considerada o principal fator de virulência do microrganismo tendo uma grande importância na invasão (Bogaert *et al.*, 2004; García-Suárez *et al.*, 2006; Kadioglu *et al.*, 2008) ⁴; ¹¹; ⁴⁴. Durante a colonização das vias aéreas superiores, a CPS evita o aprisionamento no muco nasal, permitindo o acesso do microrganismo às superfícies epiteliais além de ser fortemente antifagocitária (Kadioglu *et al.*, 2008) ⁴⁴. Além disso, ela é capaz de proporcionar resistência à autólise espontânea ou induzida por antibióticos, contribuindo assim para a tolerância das cepas aos antibióticos.

A capacidade infecciosa dos pneumococos difere entre os diferentes sorotipos capsulares, os quais possuem diferentes composições de PS, sendo que a estrutura química destes PS e a espessura da CPS determinam as diferenças que os sorotipos têm de sobreviver na corrente sanguínea e causar doenças invasivas. Provavelmente isso acontece por diferenças nos processos de ativação da via alternativa do sistema complemento e de deposição e degradação dos componentes do complemento na cápsula (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Kadioglu *et al.*, 2008) ²; ⁴⁴. Além de ser um fator de virulência primário a CPS é alvo nas reações sorológicas para a identificação e diferenciação dos sorotipos (Teixeira, Merquior e

Trabulsi *in* Trabulsi e Althertun, 2008)¹. Mais recentemente tem se discutido que o tamanho da cadeia bacteriana formada pelos pneumococos pode conferir uma vantagem seletiva durante a infecção sistêmica ou colonização. O crescimento na forma de diplococos parece ser vantajoso durante a infecção invasiva devido a menor deposição do sistema complemento, enquanto que a formação de longas cadeias pode favorecer a aderência bacteriana às células epiteliais durante a colonização (Dalia e Weisser, 2011; Rodriguez *et al.*, 2012)^{45; 46}.

Acredita-se que a diversidade de CPS em pneumococos tenha surgido como consequência da seleção antigênica imposta pelo sistema imunológico humano. Comparações entre os genes que codificam os PS indicam uma variedade de mecanismos genéticos envolvidos e demonstram que os genes centrais responsáveis pela síntese e polimerização da unidade de repetição são altamente variáveis e muitas vezes não homólogos entre os sorotipos. Assim, novos sorotipos podem ser gerados pela introdução de novos genes ou por transferência lateral de genes a partir de outras espécies (Bentley *et al.*, 2006)⁴⁷.

O fenômeno da mudança capsular é visto em sorotipos isolados de doenças invasivas bem como em sorotipos carreados na nasofaringe humana. Este potencial de substituição capsular nos sorotipos é de grande importância clínica, especialmente quando ocorre entre as linhagens resistentes aos antibióticos e tem implicações para a eficácia de longo prazo das vacinas pneumocócicas conjugadas (García-Suárez *et al.*, 2006; Marks *et al.*, 2012)^{4; 48}.

1.4.2 Parede celular

As estruturas básicas da parede celular dos pneumococos são: peptidoglicano, ácidos teicóicos e lipoteicóicos. O ácido teicóico (polissacarídeo C) está ligado aos resíduos de ácido murâmico do peptidoglicano e o ácido lipoteicóico aos lipídeos da membrana citoplasmática. Ambos são ricos em fosforil-colina, molécula chave no processo de invasão, além de atuarem no processo de adesão como adesinas e sendo sítio de ligação das proteínas que se ligam a colina (CBP). A parede celular dos pneumococos é forte indutora de inflamação, assim a estrutura como um todo pode ser considerada um importante fator de virulência (Teixeira, Merquior e Trabulsi, 2008)¹.

1.4.3 Proteínas consideradas potenciais candidatos vacinais

Proteínas ou enzimas, que são de alguma forma expostas na superfície do microrganismo, podem contribuir para a patogenicidade e estar envolvidas no processo de infecção da doença (Jedrzejewski *et al.*, 2001; Bogaert *et al.*, 2004)^{11; 49}. Muitas vezes, estas proteínas estão envolvidas diretamente nas interações com o tecido do hospedeiro ou nos mecanismos para encobrir a superfície bacteriana do sistema de defesa do hospedeiro

(Jedrzejak *et al.*, 2001) ⁴⁹. No caso de pneumococo, estima-se que este possua mais de 100 proteínas de superfície, sendo que muitas destas têm algum tipo de função que contribui para a patogenicidade do microrganismo (Barocchi *et al.*, 2007) ⁵⁰.

A pneumolisina (Ply) pertencente ao grupo conhecido como citolisinas colesterol-dependentes é uma enzima citoplasmática importante na patogênese da doença (Bogaert *et al.*, 2004) ¹¹. Ela é altamente conservada, presente em todas as cepas de pneumococos e é um antígeno capaz de induzir proteção (García-Suárez *et al.*, 2006) ⁴. Também tem sido reportada a utilização de pneumolisinas detoxificadas (pneumolisóides), via mutação sítio-específica ou detoxificação química, demonstrando que estas proteínas são capazes de promoverem proteção em camundongos contra desafio intranasal letal (Salha *et al.*, 2012) ⁵¹.

A neuramidase Nan (sialidase), amplamente presente nas cepas de pneumococos, se apresenta pelo menos em duas formas, NanA (necessária para a colonização da mucosa) e NanB (contribui para a sobrevivência do pneumococo no sangue) (Manco *et al.*, 2006) ⁵². Estas proteínas atuam deixando as superfícies da célula do hospedeiro mais expostas (Jedrzejak *et al.*, 2001; King *et al.*, 2006) ^{49; 53} assim como diminuem a viscosidade das superfícies mucosas, facilitando a adesão (Bogaert *et al.*, 2004) ¹¹. A proteína NanA foi capaz de induzir proteção em modelo experimental de colonização e otite em chinchilas (Long *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2005) ^{54; 55}.

A PspA (proteína A de superfície de pneumococo - “pneumococcal surface protein A”) pertence ao grupo das CBP (Jedrzejak *et al.*, 2001; Bogaert *et al.*, 2004) ^{11; 49} e situa-se ancorada na parede celular do pneumococo. A PspA é amplamente presente nas cepas de *S. pneumoniae* (Jedrzejak *et al.*, 2001) ⁴⁹, no entanto, apresenta um elevado polimorfismo (García-Suárez *et al.*, 2006) ⁴. Esta proteína tem a capacidade de reduzir os níveis de fagocitose do microrganismo pelas células apresentadoras de antígenos inibindo a ativação da via clássica do sistema complemento (Jedrzejak *et al.*, 2001; Mukerji *et al.*, 2012) ^{49; 56}. A imunização com PspA induz a formação de anticorpos que reconhecem a superfície intacta dos pneumococos e promove a opsonização pela deposição de C3 (Ren *et al.*, 2012) ⁵⁷. Assim sendo, PspA é uma das proteínas mais estudadas como antígeno para composição de uma vacina, demonstrando bons resultados em modelo animal (Jedrzejak *et al.*, 2001; Bogaert *et al.*, 2004; García-Suárez *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010) ^{4; 11; 49; 58}.

As autolisinas são capazes de degradar peptideoglicanos da parede celular. Um exemplo destas autolisinas é a LytA amidase (N-acetilmuramoil-L-alanina amidase - “N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase”), que também pertencente ao grupo das CBP, estando envolvida na patogenicidade do microrganismo e já tendo demonstrado bons resultados quando utilizada como antígeno em modelo animal (Yuan *et al.*, 2011) ⁵⁹. A LytC é uma

hidrolase constitutivamente expressa e contribui para o mecanismo de lise bacteriana e juntamente com LytA e CbpD (proteína D que se liga à colina e cuja função é ser uma mureína hidrolase - “choline binding protein D”), são as principais proteínas mediadoras da lise de células não competentes (Eldholm *et al.*, 2009)⁶⁰.

Outra proteína de superfície também pertencente ao grupo das CBP é a CbpA (“choline binding protein A”) também conhecida por PspC, SpsA (proteína ligadora de IgA secretora de *S. pneumoniae* – “secretory IgA binding protein”), Hic (fator H inibidor do complemento- “factor-H binding inhibitor of complement”) e proteína de ligação a C3 (“C3-binding protein”), é uma proteína multifuncional, polimórfica, exposta na superfície bacteriana, capaz de interagir com o sistema complemento através da ligação de C3 e fator H, e além disso atua como molécula de adesão através da interação com sIgA (imunoglobulina A secretora) (Darrieux *et al.*, 2013; Miyaji *et al.*, 2013)^{61; 62}. Trabalhos demonstram que esta proteína é capaz de proteger camundongos contra desafios intranasais e intraperitoniais (Ogunniyi *et al.*, 2001; Balachandran *et al.*, 2002)^{63; 64}.

A PsaA (“pneumococcal surface adhesin A”), uma lipoproteína ligante de metal, é outra proteína relacionada à virulência de *S. pneumoniae* presente em todas as cepas de pneumococos (Morrison *et al.*, 2000; Bogaert *et al.*, 2004; Barocchi *et al.*, 2007)^{11; 50; 65}. Essa proteína faz parte de um sistema de transporte de manganês e zinco para o citoplasma da bactéria e está ancorada na membrana celular (Rajam *et al.*, 2008)⁶⁶, assim como apresenta função importante na resistência ao estresse oxidativo (Tseng *et al.*, 2002)⁶⁷. Diversos trabalhos demonstram e destacam as características estruturais e bioquímicas da PsaA, assim como suas funções e seu potencial como candidato vacinal (Seo *et al.*, 2002; Pimenta *et al.*, 2006; Rajam *et al.*, 2008)^{66; 68; 69}.

As proteínas PiuA (proteína pneumocócica captadora de ferro - “pneumococcal iron uptake”) e PiaA (proteína pneumocócica aquisidora de ferro - “pneumococcal iron acquisition”) são lipoproteínas componentes de dois sistemas de transporte do tipo ABC de pneumococos e são essenciais para a aquisição de ferro do meio (Brown *et al.*, 2001)⁷⁰. Ambas as proteínas são conservadas entre as amostras de pneumococos e estudos de proteção demonstram que a vacinação de mucosa e intramuscular em camundongos protege contra desafio intranasal e intraperitonal (Brown *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2006; Whalan *et al.*, 2006)^{70; 71; 72}.

A ClpP é uma serino-protease pertencente ao grupo conhecido como proteínas de choque térmico (Kwon *et al.*, 2004)⁷³. Esta proteína desempenha alguns papéis na virulência de *S. pneumoniae*, sendo um deles a modulação da expressão de genes de virulência. Cepas mutantes nesta proteína, quando comparadas a cepas selvagens, mostraram-se menos

virulentas, o que reforça a ideia de que a ClpP seria um bom candidato para a composição de uma vacina (Kwon *et al.*, 2004)⁷³. Já foi demonstrado que essa proteína é capaz de conferir proteção em modelo murino contra infecções pneumocócicas (Kwon *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2007)^{73; 74}.

As proteínas StkP (serina/treonina proteína quinase - “serine/threonine protein kinase”) e PcsB (proteína necessária para a separação celular do *Streptococcus* do grupo B - “protein required for cell wall separation of group B *Streptococcus*”) são altamente conservadas em pneumococos e demonstraram atividade protetora, em modelos animais, para sepse e pneumonia (Giefing *et al.*, 2008)⁷⁵.

As proteínas PavA e B (fator A e B de aderência e virulência pneumocócica - “pneumococcal adherence and virulence factor A e B”) estão envolvidas no processo de adesão da bactéria. A proteína PavA está envolvida na modulação do processo de aderência, invasão e inflamação das meninges (Pracht *et al.*, 2005)⁷⁶. Em relação a proteína PavB estudos demonstram que esta proteína é exposta à superfície bacteriana, capaz de interagir com fibronectina e plasminogênio e contribui para a colonização do pneumococo. Em modelo animal, camundongos infectados intranasalmente com pneumococos mutantes em PavB mostraram que estas bactérias são capazes de sobreviver por mais tempo que as bactérias selvagens no trato respiratório; assim como demonstraram um atraso na transmigração para os pulmões (Jensch *et al.*, 2010)⁷⁷.

Além das proteínas descritas acima, muitas outras têm sido identificadas e propostas como candidatos vacinais, demonstrando proteção em modelo murino para sepse, colonização e pneumonia, podemos citar as proteínas de pili (RrgA, RrgB e RrgC) (Barocchi *et al.*, 2006; Harfouche *et al.*, 2012)^{78; 79}; a PcpA (proteína A pneumocócica ligadora de colina - “pneumococcal choline-binding protein A”) (Glover *et al.*, 2008)⁸⁰; a PppA (proteína A pneumocócica protetora - “pneumococcal protective protein A”) (Green *et al.*, 2005)⁸¹; a StrA (sortase A) (Peterson *et al.*, 2006)⁸²; a PpmA (proteína A maturação proteinase - “putative proteinase maturation protein A”) (Cron *et al.*, 2009)⁸³; a PotD (proteína D de transporte de poliaminas - “polyamine transport protein D”) (Shah *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2009)^{84; 85}; a PgdA (peptideoglicano N-acetilglucosamina deacetilase - “peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase”) (Vollmer *et al.*, 2000 e 2002)^{86; 87}; a PfbA (proteína ligadora de plasmina e fibronectina - “plasmin- and fibronectin-binding protein”) (Yamaguchi *et al.*, 2008)⁸⁸.

1.5. Vacinas

Aliada a melhoria do saneamento e a descoberta e utilização de antibióticos, a vacinação

é a intervenção que apresenta maior impacto sobre a saúde humana; além disso, as vacinas representam o melhor modo custo-efetivo de salvar vidas (Delany *et al.*, 2013)⁸⁹.

As tentativas, no início do século XX, para induzir imunidade protetora contra pneumococos em seres humanos por meio de vacinação utilizando bactérias mortas não foram muito bem sucedidas, sendo esta abordagem abandonada devido aos efeitos colaterais adversos causados pela grande quantidade de inóculos utilizados. Na década de 1930, quando a sorotipagem pneumocócica estava sendo desenvolvida a imunogenicidade dos PS purificados foi demonstrada. Estudos foram efetuados com os PS produzindo resultados satisfatórios, o que culminou com o licenciamento de uma vacina pneumocócica hexavalente baseada em PS (Bruyn *apud* AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995)². No entanto, por causa do entusiasmo no mundo da medicina sobre a eficácia terapêutica dos antibióticos, essa vacina era raramente utilizada e foi retirada do mercado. Apesar do uso de antibióticos, a taxa de mortalidade causada por doenças pneumocócicas sistêmicas permaneceu elevada e começaram a surgir os pneumococos resistentes a antibióticos (Appelbaum *apud* AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995)². Assim, novos esforços foram realizados na década de 1970 para desenvolver melhores vacinas pneumocócicas baseadas em PS. Em 1978, a vacina 14-valente foi licenciada nos Estados Unidos e, em 1983, a 23-valente (Pneumovax 23 - Merck) tornou-se disponível (Bruyn e Lee *apud* AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995)². Esta vacina inclui os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F que são responsáveis por causarem 90% e 88% das doenças IPD no Reino Unido e Estados Unidos da América, respectivamente (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Hausdorff *et al.*, 2005)^{2; 24}. No Brasil a vacina 23-valente foi licenciada em 1992 (Ministério da Saúde, 2010)²⁵.

As vacinas polissacarídicas provocam uma resposta baseada em anticorpos e induzem proteção em adultos saudáveis. No entanto a vacina é fracamente imunogênica em grupos populacionais que estão em alto risco de contrair doença pneumocócica, como crianças <5 anos de idade, idosos >65 anos de idade, pacientes asplênicos, com infecções frequentes do trato respiratório, pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana ou que estão sob tratamento com imunossuppressores, pacientes com doenças crônicas (nefropatias, doenças cardiorespiratórias, diabetes, alcoolismo, cirrose, entre outras). Além disso essas vacinas têm seu período de proteção limitado (Bogaert *et al.*, 2004; Bricks *et al.*, 2006; García-Suárez *et al.*, 2006; Pletz *et al.*, 2008)^{3; 4; 11; 13}.

A vacina polissacarídica 23 valente apresenta como vantagem o alto número de sorotipos contemplados (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Bogaert *et al.*, 2004; Braido *et al.*, 2008; Pletz *et al.*, 2008; Schachern *et al.*, 2009)^{2; 3; 11; 90; 91}, no entanto esta vacina não é

eficiente em <2 anos de idade, devido à ausência de linfócitos B maduros que induzem uma melhor resposta contra carboidratos. Além disso, respostas substanciais contra os sorotipos pediátricos mais comuns (6A, 14, 19F e 23F) são observadas apenas após a idade de 4 a 5 anos. Esse tipo de vacina também não confere imunidade dependente das células T, não induz uma boa memória imunológica e tem pouco ou nenhum impacto nos portadores nasofaríngeos do agente infeccioso. Assim, o desenvolvimento de novas gerações de vacinas pneumocócicas se fez necessário para proteger esse grupo de pessoas suscetíveis às infecções pneumocócicas (Braidó *et al.*, 2008)⁹⁰.

Diante do exposto, o uso de uma vacina pneumocócica conjugada, e imunogênica para crianças a partir dos dois meses de vida, tem sido considerada uma estratégia potencial e um avanço na profilaxia para o controle das infecções causadas por pneumococos.

As vacinas conjugadas são física e imunologicamente diferentes de suas concorrentes não conjugadas, sendo altamente imunogênicas em crianças, indutoras da imunidade dependente de células T e geradoras de altos níveis de anticorpos, conferindo assim imunidade protetora contra infecções pneumocócicas invasivas. Também são eficazes para redução do número de portadores nasofaríngeos dos sorotipos presentes na formulação da vacina (Pletz *et al.*, 2008)³.

Atualmente há em torno de 94 sorotipos de pneumococos identificados e, como descrito no item 1.2, vários são os sorotipos que causam doença com diferenças na distribuição e prevalência destes entre as regiões geográficas. Além disso a imunidade induzida aparentemente é sorotipo-específica (Nascimento-Carvalho *et al.*, 2003; Pletz *et al.*, 2008)³; ¹⁷. Miyaji *et al.* (2013)⁶¹ descreve em seu trabalho diversos estudos os quais têm demonstrado que as vacinas conjugadas protegem contra a colonização e doenças invasivas, porém conferem pouca proteção contra otite média e pneumonia. Portanto, para o amplo uso da vacina pneumocócica conjugada, é necessário o adequado conhecimento da distribuição dos sorotipos mais prevalentes em cada região a fim de se avaliar a eficácia das novas vacinas conjugadas e rastrear o surgimento dos sorotipos não incluídos nas vacinas (Nascimento-Carvalho *et al.*, 2003; Selva *et al.*, 2012)^{17; 92}.

Atualmente no Brasil há três vacinas conjugadas licenciadas: a 7-valente (PCV7), a 10-valente (PCV10) e a 13-valente (PCV13), sendo que as duas últimas vacinas substituíram a PCV7 que saiu do mercado. A primeira vacina conjugada licenciada no mundo foi a Prevnar ou Prevenar 7 (Wyeth/Pfizer) (PCV7), nos Estados Unidos da América em 2000, e lentamente tornou-se disponível a nível mundial, sendo licenciada no Brasil em 2001. Ela é uma vacina composta por polissacarídeos capsulares de sete sorotipos diferentes, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados a uma variante atóxica (CRM₁₉₇) da toxina diftérica obtida de culturas da

cepa C7 (b197) do *Corynebacterium diphtheriae* e permite a prevenção de IPD e pneumonia em crianças <5 anos de idade. Nessa faixa etária, a maior cobertura da PCV7 tem sido reportada nos Estados Unidos da América, Canadá e Austrália (80-90%), seguido por Europa e África (70-75%), América Latina (cerca 65%) e Ásia (cerca de 50%) (Robinson *et al.*, 2001; Pletz *et al.*, 2008)^{3; 24}. Estudos realizados no Brasil demonstraram que essa vacina apresentou uma cobertura de 64-69% para os isolados clínicos invasivos (Brandileone *et al.*, 2006; Laval *et al.*, 2006; Berezin *et al.*, 2007)^{20; 36; 93}.

A PCV7 demonstrou uma boa eficácia tanto em crianças como em pessoas idosas. Nos trabalhos publicados por Bricks *et al.* (2006) e Rodgers *et al.* (2011)^{13; 94} são relatados diversos estudos os quais demonstraram que a introdução da vacina PCV7 causou uma dramática redução da incidência de IPD em crianças, reduziu o uso de antibióticos e o número de consultas médicas devido a otite média e pneumonia, assim como a incidência de IPD, causada por cepas resistentes a antibióticos, diminuiu em crianças imunizadas, adultos e idosos. Também há relatos de estudos demonstrando o impacto da PCV7 na redução da colonização do trato respiratório, assim como o efeito da imunidade de rebanho (diminuição de doenças em pessoas não vacinadas em função da diminuição da circulação bacteriana na comunidade) (Davis *et al.*, 2013)⁹⁵. No entanto, essa eficácia é específica contra os sorotipos que estão presentes na composição da vacina e nem sempre representam aqueles causadores de sérias doenças pneumocócicas em muitos dos países menos desenvolvidos. Assim, ela possui cobertura limitada de sorotipos podendo alcançar de 65-80% dos sorotipos relacionados a IPD em crianças nos países industrializados ocidentais, nos quais os sorotipos presentes nesta vacina são os mais prevalentes (Bricks *et al.*, 2006; Rodgers *et al.*, 2011)^{13; 94}.

Até recentemente a vacinação com a PCV7, no Brasil, estava disponível somente em clínicas privadas de imunização e nos Centros de Referência em Imunobiológicos Especiais (para crianças <5 anos de idade com alto risco de contraírem IPD). No entanto, a partir de 2010, o Ministério da Saúde (MS) através de um acordo de transferência de tecnologia entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)/Bio-Manguinhos e a empresa multinacional “GlaxoSmithKline Biologicals” (GSK), incluiu a PCV10 (Synflorix) no Calendário Básico de Vacinação do Programa Nacional de Imunização (Lobato, 2010)⁹⁶. Na sua composição a PCV10 apresenta além dos PS dos sorotipos presentes na PCV7, os PS dos sorotipos 1, 5 e 7F. Oito destes PS (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 23F) estão conjugados à proteína D do *Haemophilus influenzae* e os outros dois estão conjugados à proteína CRM₁₉₇ (19F) e à toxina tetânica (18C) (Ministério da Saúde, 2010)²⁵. Estima-se que a cobertura desta vacina para os sorotipos causadores de pneumonia e meningite, no Brasil, é em torno de 78,9% (Castañeda *et al.*, 2009)⁹⁷.

A PCV13 (Prevenar 13 - Pfizer) por sua vez apresenta em sua composição além dos PS dos sorotipos presentes na PCV10, os PS dos sorotipos 3, 6A e 19A, todos eles conjugados a proteína carreadora CRM₁₉₇, no entanto até o momento esta vacina está disponível apenas nas clínicas privadas. Estima-se que a cobertura desta vacina para os sorotipos causadores de IPD, no Brasil, é em torno de 79-94% (Brandileone *et al.*, 2006; Laval *et al.*, 2006; Berezin *et al.*, 2007; Catañeda *et al.*, 2009)^{20; 36; 93; 97}. A importância da abrangência do sorotipo 19A é que estudos têm relatado o fato deste sorotipo apresentar resistência diminuída a ampicilina e resistência aos macrolídeos (Yoshioka *et al.*, 2011; Varon, 2012)^{6; 19}. Cooper *et al.* (2011)⁹⁸ descreveram que a PCV13 é capaz de gerar anticorpos opsonizantes contra o sorotipo 6C e 7A, demonstrando o potencial desta vacina em induzir uma resposta protetora cruzada para alguns sorotipos não contemplados na vacina.

A vacina conjugada 15 valente (PCV15) (Merck) foi aprovada na fase pré-clínica utilizando como modelo experimental macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) de 2 a 3 meses de idade. Este modelo animal foi utilizado devido a similaridade da resposta imunológica em relação a crianças <2 anos de idade. Esta vacina apresenta além dos PS dos 13 sorotipos presentes na PCV13, os PS dos sorotipos 22F e 33F, cuja incidência em crianças americanas está em elevação, todos conjugados a CRM₁₉₇. A PCV15 foi capaz de induzir uma resposta imunológica robusta (medida pela soro-conversão e com produção de anticorpos opsonizantes) contra todos os polissacarídeos utilizados (Skinner *et al.*, 2011)⁹⁹.

Assim, fica clara a grande importância das vacinas conjugadas para a redução das doenças pneumocócicas. No entanto diversos estudos têm demonstrado que a população de sorotipos de pneumococos têm mudado após a introdução das PCV. Os sorotipos não vacinais têm aumentado entre carreadores assintomáticos em um processo chamado de "substituição de sorotipos" (Spratt & Greenwood, 2000)¹⁰⁰, bem como nos casos de doenças invasivas (Varon, 2012; Miyaji *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2013)^{6; 61; 101}. Essas mudanças a médio e longo prazos apresentam o potencial de diminuir o benefício global destas vacinas na saúde pública (Weinberger *et al.*, 2011)¹⁰².

Além do exposto anteriormente, as PCV englobando um grande número de sorotipos também apresentam como principal problema o custo elevado do processo de produção, o que inviabiliza a sua utilização em muitos programas de vacinação em países menos desenvolvidos (Miyaji *et al.*, 2013)⁶¹. Uma alternativa para a baixa proteção em determinadas faixas etárias e para os custos elevados das PCV é o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos pneumocócicos protéicos altamente conservados e diretamente relacionados com a virulência de pneumococos, a utilização de vacinas baseadas em bactérias inteiras ou o uso de bactérias recombinantes expressando antígenos de pneumococos (Miyaji *et al.*, 2013;

1.6. Vacinologia reversa

A vacinação é a prática pelo qual os indivíduos inoculados com formas inativadas ou atenuadas de um agente infeccioso se tornam imunes à infecção causada por este agente. Esta prática tem permanecido praticamente inalterada por quase dois séculos. A primeira grande revolução foi o desenvolvimento de vacinas de subunidades, quando foi percebido que os componentes do microrganismo podem ser suficientemente antigênicos e imunogênicos, diminuindo os indesejáveis efeitos colaterais provocados pelas vacinas clássicas. Desde então, a maioria dos esforços em pesquisa de vacina tem sido dedicada a identificar o componente ou uma mistura de componentes capaz de proteger contra a doença. As principais características destas moléculas são a sua presença e conservação no agente infeccioso, o seu reconhecimento pelo sistema imune e a sua capacidade de induzir uma resposta imune protetora. Um dos métodos utilizados para a identificação de alvos vacinais é a análise de soros de indivíduos infectados que são protegidos contra a reinfeção. Esse procedimento normalmente é capaz de identificar um conjunto restrito de possíveis candidatos vacinais que dominam a resposta imunológica do hospedeiro, mas deixa de identificar os componentes que não sejam altamente imunogênicos durante a infecção e que ainda assim são capazes de conferir imunidade protetora (Donati e Rappuoli, 2011)¹⁰³.

Desde o final da década de 1990, o desenvolvimento das tecnologias de seqüenciamento mudaram o campo da vacinologia. Quando o genoma do primeiro organismo vivo foi sequenciado em 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995)¹⁰⁴, percebeu-se que as tecnologias genômicas, através da determinação de todo o potencial proteômico do organismo infeccioso, poderiam aumentar as chances de identificação de proteínas a serem utilizadas para desenvolver uma vacina eficaz. Essa nova metodologia recebeu o nome de vacinologia reversa e ofereceu duas vantagens principais: permitiu a identificação de um espectro mais amplo de candidatos e a identificação de potenciais alvos em microrganismos difíceis de serem cultivados em laboratório (Donati e Rappuoli, 2011)¹⁰³.

A vacinologia reversa foi primeiramente aplicada para o desenvolvimento de vacinas contra *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B (Pizza *et al.*, 2000)¹⁰⁵. Atualmente, com a disponibilidade das sequências genômicas de diversos patógenos, é possível realizar análises genômicas e proteômicas comparativas a fim de selecionar potenciais alvos vacinais que sejam compartilhados e conservados entre os diversos microrganismos, permitindo a chamada vacinologia reversa pan-genômica (Gamberini *et al.*, 2005; John *et al.*, 2012; Oprea e Antohe, 2013; Simionatto *et al.*, 2013; Xiang e He, 2013; Talukdar *et al.*, 2014)^{106; 107; 108; 109; 110; 111}.

A vacinologia reversa baseada no genoma e proteoma resultou na descoberta de vários antígenos de pneumococos candidatos vacinais que estão hoje em fase de desenvolvimento pré-clínico e clínico (Miyaji *et al.*, 2013) ⁶¹.

Na revisão realizada por Moffitt *et al.* (2011) ¹¹² estão descritos diversos trabalhos nos quais foi utilizada a vacinologia reversa para identificar antígenos de pneumococos que poderiam ser candidatos vacinais. Dentre as técnicas de vacinologia reversa descritas temos a identificação de genes que codificam para proteínas de superfície celular, incluindo proteínas que apresentam sinal para secreção ou sequências líder hidrofóbicas, as quais são prováveis de se ligarem à parede celular bacteriana, e a identificação de antígenos de pneumococos que são reconhecidos por células TH17, importantes para protegerem os animais contra colonização (Adamou *et al.*, 2001; Wizemann *et al.*, 2001) ^{113; 114}.

Outra técnica envolve o uso da proteômica, onde bibliotecas de proteínas são avaliadas para alvos imunogênicos. Essa metodologia tem sido utilizada para identificar antígenos a partir de soro de pacientes convalescentes com IPD (Giefing *et al.*, 2008) ⁷⁵.

Choi *et al.* (2012) ¹¹⁵ identificaram antígenos de pneumococos utilizando a imunoproteômica. Nesse estudo as proteínas secretadas (secretoma) foram identificadas por proteômica utilizando espectrometria de massa associada a cromatografia líquida. Morszeck *et al.* (2008) ¹¹⁶ utilizaram a proteômica para identificar antígenos associados a parede celular bacteriana. Diversas das proteínas descritas no item 1.4.3 foram descobertas na era das “ômicas” e com o emprego da vacinologia reversa.

Mais recentemente tem sido discutida a vacinologia estrutural a qual permite construir antígenos vacinais mais estáveis, homogêneos e eficientes (Dormitzer *et al.*, 2008) ¹¹⁷. Dormitzer *et al.* (2012) ¹¹⁸ descreveram diversos antígenos os quais têm sido melhorados baseados na vacinologia estrutural, utilizando técnicas de cristalografia de raios-x e ressonância magnética nuclear. Dentre estes antígenos estão o fHbp (proteína ligadora de fator H) de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B, pili de *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*), a glicoproteína F (fusão) do vírus sincicial respiratório entre outros.

1.7. *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

O advento da engenharia genética permitiu que proteínas recombinantes importantes para a produção de vacinas, biofármacos e reagentes para diagnóstico pudessem ser produzidas e purificadas em larga escala com o objetivo de suprir a demanda da indústria farmacêutica (Demain e Grandi, 2012) ¹¹⁹.

Proteínas recombinantes podem ser expressas em bactérias, leveduras, células de mamíferos, plantas ou insetos. A escolha do sistema de expressão deve levar em consideração

a velocidade de produção e rendimento almejado, além da estrutura e funcionalidade proteica (Terpe, 2006; Domain e Grandi, 2012) ^{119; 120}. Sistemas de expressão bacterianos para produção de proteínas heterólogas são os mais utilizados por serem bem caracterizados geneticamente, apresentarem rápido crescimento em meios de cultura com baixo custo e existência de uma grande variedade de cepas mutantes disponíveis. Entretanto, se modificações pós traducionais são essenciais, sistemas procariotos não são indicados, uma vez que são incapazes de realizar tais modificações, nesse caso hospedeiros alternativos como leveduras e células de insetos e mamíferos podem ser utilizados (Terpe, 2006) ¹²⁰.

Entre os sistemas procariotos para expressão de proteínas, *E. coli* é uma bactéria amplamente utilizada na produção de proteínas heterólogas devido ao rápido e fácil crescimento em meios de cultura de baixo custo, eficiente expressão e bom rendimento de proteínas recombinantes. São microrganismos bem caracterizados geneticamente e há um grande número de cepas mutantes disponíveis. Além disso, este microrganismo possui a capacidade de acumular mais de 80% do seu peso seco em proteína recombinante e sobreviver em diversas condições ambientais (Demain e Vaishnav, 2009) ¹¹⁹.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as questões expostas no tópico introdutório, torna-se clara a importância do *S. pneumoniae* como causador de diversas formas clínicas da doença pneumocócica, a qual apresenta alta mortalidade e morbidade. Os dois tipos de vacinas – polissacarídicas ou conjugadas - disponíveis atualmente no mercado, apresentam algumas limitações. A vacina polissacarídica não confere proteção em crianças <2 anos de idade (grupo de alto risco) e há necessidade de doses de reforço para idosos. As vacinas conjugadas apresentam um limitado espectro de sorotipos e conferem proteção sorotipo-específica, fato que pode levar a uma pressão seletiva e a substituição dos sorotipos mais prevalentes em doença invasiva, além de apresentarem alto custo de produção, limitando a sua utilização em larga escala em programas de imunização nos países em desenvolvimento.

Assim, a identificação de antígenos proteicos expostos na superfície celular bacteriana que sejam amplamente distribuídos e conservados entre os diferentes sorotipos de pneumococos são altamente interessantes para utilização como componentes no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas de sub-unidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar “in silico” proteínas de superfície conservadas entre os diversos sorotipos de pneumococos para clonagem e expressão em *E. coli* a fim de serem avaliadas e caracterizadas quanto ao seu papel biológico preditivo, visando propor antígenos que possam ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina de sub-unidade baseada em proteína recombinante

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar e selecionar “in silico” proteínas conservadas e expostas na superfície celular bacteriana por meio de análises genômicas (vacinologia reversa baseada na pan-genômica);
2. Clonar e expressar os genes selecionados em *E. coli*;
3. Avaliar a solubilidade e purificar as proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade utilizando íon metálico imobilizado (IMAC) e cromatografia líquida rápida (FPLC – “Fast Performance Liquid Chromatography”);
4. Produzir anticorpos policlonais em camundongos contra as proteínas recombinantes e avaliar, por “immunoblotting”, a antigenicidade dessas proteínas;
5. Avaliar, por “immunoblotting”, a antigenicidade das proteínas recombinantes frente a soros de pacientes com meningite pneumocócica causada por diferentes sorotipos;
6. Realizar ensaios de localização celular, pelas técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta, das proteínas selecionadas em pneumococos para confirmar os dados preditivos obtidos “in silico”;
7. Avaliar o papel das proteínas selecionadas em relação à inibição da adesão bacteriana às células eucarióticas A549, utilizando os anticorpos policlonais gerados nos camundongos contra esses antígenos;
8. Avaliar a interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular;
9. Avaliar a presença e o grau de identidade dos alvos selecionados entre amostras de origem clínica isolados no Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Sequenciamento e anotação do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 5 cepa 617/00

A bactéria *S. pneumoniae* sorotipo 5 cepa 617/00 (SPN 5 617/00), isolada de líquido cefalorraquidiano e sensível a penicilina foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Cristina Brandileone do IAL/São Paulo/Brasil. O ADN da bactéria foi sequenciado pela metodologia de pirosequenciamento utilizando a plataforma 454 (sistema GS-FLX) no Instituto de Bioinformática da Virgínia (VBI). Para a montagem do genoma foi utilizado o Newbler assembler v1.1.03.24 e para a anotação foi utilizado o programa GLIMMER (“Gene Locator and Interpolated Markov Model”) (Salzberg *et al.*, 1998) ¹²¹. Os ácidos ribonucleicos transportadores foram identificados utilizando-se o programa tRNAscan-SE 1.21 (Lowe, 1997) ¹²². Este genoma não foi publicado até o momento.

4.2. Montagem dos bancos de dados

Inicialmente foram gerados dois bancos de dados: (i) um contendo proteínas de 26 genomas de pneumococos, englobando 13 diferentes sorotipos (2, 3, 4, 5, 6A, 9F, 9V, 11, 14, 18C, 19A, 19F e 23F), designado por ‘banco de proteínas pneumocócicas’ e outro (ii) contendo proteínas de *Streptococcus* sp., designado ‘banco de proteínas estreptocócicas’, contendo as proteínas dos 26 genomas de pneumococos e mais as proteínas de 34 genomas de *Streptococcus* sp., englobando 10 diferentes espécies (*S. equi* subespécie *equi*, *S. pyogenes*, *S. infantarius* subespécie *infantarius*, *S. gordonii*, *S. suis*, *S. sanguinis*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*, *S. uberis*, *S. mutans*). Os genomas selecionados englobavam, na data de montagem dos bancos, 38 genomas completos, sendo 11 de *S. pneumoniae* e 27 de *Streptococcus* sp., e 21 projetos WGS (“Whole Genome Shotgun”) sendo 14 de *S. pneumoniae* e 7 de *Streptococcus* sp., totalizando 59 genomas obtidos da base de dados de seqüências genéticas (“GenBank”) em <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomas/Bacteria> e [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomas/Bacteria Draft](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomas/Bacteria_Draft).

O critério de seleção para a escolha das espécies foi: (a) os genomas estarem disponíveis no “GenBank” na data de criação dos bancos de dados, que foi em Abril de 2009 e (b) presença de pelo menos 1.500 proteínas anotadas por genoma. Neste estudo também foram incluídas as 2.028 proteínas do genoma de SPN 5 617/00, considerado um projeto WGS. No Anexo 1 encontram-se descritos os genomas utilizados para a montagem dos bancos de dados, assim como o número de proteínas anotadas por genoma, o estatus dos sequenciamentos quando da montagem dos bancos, as características das cepas, publicações e centros que realizaram os sequenciamentos das amostras.

4.3. Seleção das proteínas presentes em pneumococos

As proteínas presentes em pneumococos foram selecionadas utilizando “scripts” em linguagem de programação PERL. As proteínas ortólogas foram identificadas utilizando “blastp” (“basic local alignment search tool for protein”) considerando-se 60% de identidade e 70% de sobreposição (“overlap”) para o primeiro “high score segment pair” (HSP). Inicialmente as sequências aminoacídicas das proteínas de SPN 5 617/00 foram utilizadas como sequências de entrada (“query”) e analisadas contra um banco de dados contendo as sequências aminoacídicas das proteínas pneumocócicas, a fim de obtermos as proteínas ortólogas compartilhadas pelos 26 genomas de pneumococos. A seguir, as sequências aminoacídicas das proteínas ortólogas identificadas foram utilizadas como sequências de entrada e avaliadas, em uma segunda busca, utilizando “blastp”, contra o banco de dados das sequências aminoacídicas das proteínas estreptocócicas; assim as proteínas “housekeeping” e aquelas presentes nas outras espécies do gênero *Streptococcus*, ou seja, as proteínas que não eram específicas de pneumococos, foram excluídas.

4.4. Análises “in silico”

As proteínas identificadas em pneumococos foram analisadas “in silico” para a predição de presença de peptídeo sinal, região transmembrana, motivo “lipobox” e localização sub-celular extracelular, utilizando os seguintes programas de bioinformática:

- a) “Phobius” para predição da presença de regiões transmembrana e presença de peptídeo sinal (Kall *et al.*, 2004) ¹²³,
- b) “SignalP 3.0 Server” para predição da presença de peptídeo sinal e da presença e localização do sítio de clivagem do peptídeo sinal (Nielsen *et al.*, 1997) ¹²⁴,
- c) “SOSUI” e “SOSUISignal” para predição da estrutura secundária de proteínas de membrana e predição da presença de peptídeo sinal (Hirokawa *et al.*, 1998) ¹²⁵,
- d) “TMHMM Server v. 2.0” para predição da presença de hélices transmembrana nas proteínas (Sonnhammer *et al.*, 1998) ¹²⁶,
- e) “Psortb v2.0.4. e v3.0.2” para predição da localização sub-celular das proteínas (Gardy *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010) ^{127; 128},
- f) “Pred-Lipo” para predição de lipoproteínas em bactérias gram positivas (Bagos *et al.*, 2008) ¹²⁹.

4.5. Cultivos bacterianos

Os meios de cultivos e as soluções utilizadas neste estudo encontram-se descritas nos Anexos 2 e 3.

As bactérias *Escherichia coli* TOP10 e BL21 Star (DE3) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (ver características das cepas no Anexo 4) foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB), em meio ágar LB ou em caldo “Terrific Broth” (TB) (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰. Quando necessário foi adicionado aos meios de cultivo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para a seleção e cultivo dos clones recombinantes de *E. coli* TOP10 e de *E. coli* BL21 Star (DE3).

As amostras de *S. pneumoniae* foram cultivadas em meio agar soja triptona [“tryptic soy agar” (TSA); Becton & Dickinson, CA, EUA] suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro ou em caldo “Todd Hewitt broth” (THB) (Becton & Dickinson) suplementado com 1% de extrato de levedura (THE).

As culturas líquidas de *E. coli* TOP10 e BL21 Star (DE3) foram crescidas sob agitação de 200 rpm a 37°C ou de modo estático, em estufa, a 37°C (placas de cultura). As culturas de pneumococos foram crescidas em cultivo estático a 37°C na presença de 5% de CO₂.

No Anexo 5 são descritas as características e fonte/referência das amostras de pneumococos utilizadas neste trabalho.

4.6. Amplificação dos genes de pneumococos por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho para as etapas de amplificação e sequenciamento gênicos foram desenhados utilizando os programas “Vector NTI v8.0” (Life Technologies), “IDT” (“Integrated DNA Technologies”) (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e “Primer Select” (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) e foram sintetizados pela empresa IDT. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes encontram-se descritos na Tabela 4.6.1.

Para verificarmos a presença dos genes *00080*, *00333*, *00397* e *00787* nas amostras clínicas de pneumococos foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores degenerados em função de os genes apresentarem polimorfismos na região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

A reação de PCR foi utilizada para amplificar os genes de pneumococos a partir dos ADN totais extraídos dos pneumococos. Um volume de 100 µL de culturas congeladas de *S. pneumoniae* foram semeadas em meio TSA suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e as placas foram incubadas a 37°C em presença de 5% de CO₂ por 16-18 h. A seguir, a massa bacteriana foi removida com THE e o material foi centrifugado a 16,000xg por 5 min. O sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com tampão salina fosfato (PBS) pH

7,4 e o ADN total extraído com o “Wizard SV Genomic DNA Purification System” (Promega, Fitchburg, Dane, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 4.6.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento gênicos de pneumococos

Número do gene em SPN 5 617/00	Seqüências nucleotídicas dos oligonucleotídeos iniciadores senso (5' - 3')	Seqüências nucleotídicas dos oligonucleotídeos iniciadores anti-senso (5' - 3')	Etapas utilizadas
00080	CACCCACTATGAACATTCTAGAAAGGG	TTATAAATCTTCTAAATTAAGTACTAGCTCAA	PCR e sequenciamento
00080 ¹	CACCCACTATSRACATTCTAGAAAGGG	TTATAMATCTTCTAAATTAAGTACTARCTCAA	PCR
00265	CACCTACCAAGATGCTAGCGCAAAGAAA	TTATCTCAAGCCCATTTGAGCGAGCTT	PCR e sequenciamento
00271	CACCCCAACAATCAATAGAGTAGGT	TTATAATTTAAAGGTTGCTACACCAAG	PCR e sequenciamento
00333	CACCTTCAATTCCGAGAATCCTTT	TTAGCCAAAGAGGACACTCATTTGAGC	PCR e sequenciamento
00333 ²	CACCTTCAATTCKCAGAAWSCTTT	TTAGCCAAAGAGRCACACTCATYTAGGC	PCR
00397	CACCAAAAAAACATTTTAACTTTA	TTATAATTTCTCGTTAACAAGCG	PCR e sequenciamento
00397 ³	CACCAAAAAAYATTTTAACTTTR	NA ⁵	PCR
01065	CACCATTGCGCTGTGCGAGGATTGAAAG	TTAGTTTCTCTCCTTATAAGGTAGTCGAA	PCR e sequenciamento
01909	CACCATCAAGGGAGCTACTGCCAAGGCT	TTAGGCCATCTGTACATACCAGAGAT	PCR e sequenciamento
02232	CACCGAAAGTTCAGGAAATAAAATC	CTACTGTCTATTCCGATTTGTTT	PCR e sequenciamento
02232	AAAGTCAATGGCAAGAAAA e CAAGATAAAGAGCAGTGG	TTTCTTGCCATTGACTTT e TACCACTGCTCTTTATCTT	Sequenciamento ⁶
00962	CACCAAGTCCGTGACTAGTGAACAC	CTAGGCTAATTCCTTCAAAGTTTGCA	PCR e sequenciamento
00962	ATTCTGGGCTTCTTGGTGT	TTTCTTGCCCTTGTAATC	Sequenciamento ⁷
02009	CACCCAGAAAAAGAACTGGACCAGC	CTATTGTTCTGTGCGCCATTTGC	PCR e sequenciamento
01929	CACCGCTACACCCAAAGAGTCCAG	TTATTGTAAGTGAATGATCTGGGAGG	PCR e sequenciamento
02072	CACCAACTCAAGCACTAGTCAGACAG	TTATTTCAAAGCTTTTTGTATGTCTTC	PCR e sequenciamento
02072	AATATCGAATCCTTAGCA	CACTTGCTAAGGATTCGATATT	Sequenciamento ⁸
00062	CACCCGTCCTATGACTGAAAATAC	TTAATTTTCGTTTTTAAGAATTTCTTC	PCR e sequenciamento
00589	CACCTACTCCAGACGCAAAAAAGGTAGT	TTATTCAATGTGGGTTGTTTGATTAGC	PCR e sequenciamento
00589	AGCCAATCAACCTACTGTG	TTGAGTTTTCCCATGACC	Sequenciamento ⁹
01195	CACCTCATCTCAAATGGACGGAATTGC'	TTAGGAAAGTGTAATAGTTCCTTTCCC	PCR e sequenciamento
01195	CAACTGATAATGTCTTCTCCTTC	AACTGCAATCGGAAGAGAG	Sequenciamento ¹⁰
01967	CACCTATTCCAGAGGAAATGGATC	CTATACTCGTTCTCCATCACTGTTTAC	PCR e sequenciamento
00787	CACCAAAAAACATTAAGGATTAACAGTA	CTATCGAACACTTTCGATTTTCCAAC	PCR e sequenciamento
00787 ⁴	CACCAAAAAACATTAARRRYTAACRGTA	NA	PCR
02118	CACCATTAATTTGATAATATTCAAATT	TTAAAATTGCAGAACGTCTGATGGTGT (par 1) e TTAAAATTGCAGAACGTCTGATG (par 2)	PCR e sequenciamento
02277	CACCACAGGTGGCCGATTTGTTG	TTACCGAACCCATTCGCCATTATAGTT	PCR e sequenciamento
02265	CACCAGCGTGCAGTCTGGTTCCACG	CTAGTCTTTCTTCGTTTTTACTACAAAAG	PCR e sequenciamento

Os oligonucleotídeos iniciadores senso apresentam em sua extremidade a sequência CACC para permitir a ligação do produto amplificado ao vetor de expressão pET100/D-TOPO (Life Technologies), que apresenta a extremidade GTTG coesiva. ¹⁻⁴oligonucleotídeos iniciadores degenerados utilizados para verificarmos a presença dos genes 00080, 00333, 00397 e 00787 nas amostras de origem clínica de pneumococos, sendo que para os genes 00397 e 00787 o oligonucleotídeo anti-senso não necessitou ser degenerado. ⁵NA - não se aplica. ⁶⁻oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento gênico com os sítios de anelamento localizados internamente nos genes.

Para a técnica de PCR foi utilizado o termociclador “Veriti 96well Thermal Cycler” (Applied Biosystems, Life Technologies). Inicialmente, para a amplificação dos genes a serem clonados no vetor de expressão pET100/D-TOPO (Life Technologies) foram realizados testes

utilizando-se diferentes concentrações finais de sulfato de magnésio (MgSO₄) e diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, a fim de estabelecermos a melhor condição de amplificação gênica pela PCR. O programa utilizado no termociclador compreendeu as etapas de desnaturação inicial de 94-95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de a) 95°C por 30 seg, b) anelamento nas temperaturas de 47-56°C (temperatura variável dependendo do oligonucleotídeo iniciador utilizado) por 30 seg, c) extensão a 68°C, quando utilizada a enzima “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Life Technologies) ou 72°C, quando utilizadas as enzimas “Biotools DNA Polymerase” (Biotools, Madri, Espanha) ou “Go Taq DNA Polymerase” (Promega), por tempo variável, dependendo do tamanho do gene amplificado, sendo empregado 1 min por kilobase (1.000 pares de bases).

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL sendo utilizadas as concentrações de 0,2 nmol de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 0,2 µmol de cada oligonucleotídeo iniciador, MgSO₄ nas concentrações finais de 1 a 3 mM, tampão de reação para concentração final 1X, ~ 1 ng de ADN total e 1 U das enzimas ADN polimerases.

A Tabela 4.6.2 apresenta as temperaturas de anelamento avaliadas na PCR para a amplificação dos genes.

Tabela 4.6.2: Temperaturas de anelamento testadas nas reações de PCR

Número do gene em SPN 5 617/00	Temperaturas de anelamento testadas	Número do gene em SPN 5 617/00	Temperaturas de anelamento testadas
00080	53°C e 54°C	00397	47°C e 48°C
00265	53°C e 54°C	02072	51°C a 56°C
00271	53°C e 54°C	00962	51°C a 56°C
00333	53°C e 54°C	00062	51°C a 56°C
00589	53°C e 54°C	01929	51°C a 56°C
00787	53°C e 54°C	02009	51°C a 56°C
02265	53°C e 54°C	02277	53°C a 56°C
01065	53°C e 54°C	01967	51°C a 56°C
01195	53°C e 54°C	02232	47°C a 50°C
01909	53°C e 54°C	02118	45°C a 52°C

Para verificarmos a positividade da PCR um volume de 10 µL das amostras, acrescidas de tampão de amostra para ADN (concentração final de 1X), comparadas ao marcador de tamanho molecular “1 kB DNA ladder” (Life Technologies), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8-1,2% utilizando tampão tris base/ácido acético glacial/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TAE). Ao final da eletroforese o gel foi tratado com “GelRed” (Biotium, Hayward, CA, EUA), os fragmentos de ADN foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e documentados utilizando-se o aparelho “L-PIX-HE”

(Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). Após a padronização da PCR realizamos novas ampliações para um volume final de 25 µL a fim de obtermos quantidades suficientes de produtos amplificados para a etapa de clonagem.

4.7. Clonagem dos genes de pneumococos

Após amplificados, os genes de pneumococos foram purificados utilizando o “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) de acordo com as normas recomendadas pelo fabricante. Os produtos da amplificação purificados foram quantificados utilizando o “Qubit dsDNA HS Assay kit” (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir os genes (insertos) foram ligados ao vetor de expressão pET100/D-TOPO (Figura 4.7.1) de 5.764 pares de bases. O vetor se baseia no emprego da enzima topoisomerase para realizar a ligação com o produto de PCR em uma única etapa. Este sistema de expressão utiliza o promotor do bacteriófago T7 modificado para conter a sequência do operador *lac*, com o objetivo de controlar a expressão de genes heterólogos em *E. coli* (INVITROGEN, Life Technologies, 2010) ¹³¹.

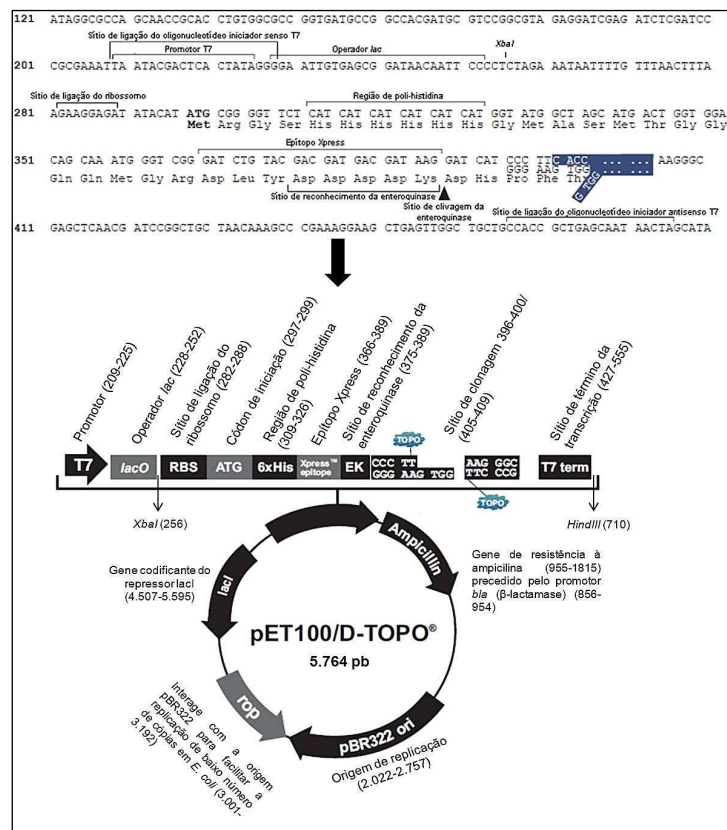


Figura 4.7.1: Vetor de expressão pET100/D-TOPO. Fonte: Modificado de Invitrogen, Life Technologies (2010) ¹³¹.

A ligação foi realizada utilizando a proporção de concentração de massa de 2 inserto:1

vetor, de acordo com as normas do fabricante. A reação foi preparada para um volume final de 6 μL e foi incubada por 20 min a 24-28°C. A seguir um volume de 100 μL de *E. coli* TOP10 eletrocompetente foi transformada por eletroporação (Downer *et al.*, 1988)¹³² com 3 μL da reação de ligação (direta ou diluída a 1:2) utilizando cubetas de eletroporação de 0,2 cm, transmitindo-se o pulso elétrico através do aparelho “MicroPulser” (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após o pulso, foram adicionados imediatamente 900 μL de caldo LB às células e estas foram crescidas sob agitação de 200 rpm a 37°C por 1 h. A seguir foram semeados 100 μL destas células transformadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e os clones transformantes foram selecionados após 18 h de incubação das placas a 37°C.

4.8. Seleção e confirmação dos clones recombinantes em *Escherichia coli* TOP10

Prováveis clones recombinantes foram selecionados em placas contendo LB ágar adicionado do antibiótico de seleção, e inoculadas individualmente em 1 mL de meio LB caldo, acrescido de antibiótico, distribuídas em placas de cultura de 24 poços (Becton & Dickinson). A incubação foi realizada a 37°C, de modo estático, por um período de 16-18 h e a seguir foi realizada a extração do ADN plasmidial a partir de 500 μL de cada cultivo utilizando o protocolo de lise alcalina adaptado de Sambrook *et al.* (1989)¹³⁰.

Após a extração, foram adicionados 10 μL de água livre de nucleases e 5 μL do ADN extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8-1,2%. Os fragmentos de ADN foram visualizados e fotografados como descrito no item 4.6.

Para confirmarmos os clones recombinantes, a partir dos pré-cultivos em placas de cultura de 24 poços, foi realizado repique e crescimento para um maior volume de cultura bacteriana para extração do ADN, a fim de obtermos material para realizarmos as etapas de digestão com enzimas de restrição e a PCR.

A partir das placas de cultura de 24 poços, contendo as culturas bacterianas com os possíveis clones recombinantes, foi realizada diluição de 1:1.000 em um volume de 10 mL de caldo LB, acrescido de antibiótico, e o material foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16-18 h. A seguir o ADN plasmidial foi extraído utilizando os “Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System” (Promega) ou o “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche, Basileia, Suíça) seguindo as recomendações dos fabricantes.

Os ADN plasmidiais foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III (Life Technologies). Para as reações de digestão foram utilizados 5 U das enzimas de restrição, 1 μL do tampão de reação 10X, cerca de 2 a 4 μL do ADN plasmidial (~100-200

ng) e água livre de nucleases para completar o volume final de 10 µL de reação, a qual foi incubada a 37°C por um período de 2 h ou de 16-18 h. Após, ao volume total da reação foi aplicado tampão de amostra para ADN (para concentração final de 1X) e o material foi analisado em gel de agarose 1,2%. Os fragmentos de ADN foram visualizados e fotografados como descrito no item 4.6.

Para as reações de PCR os ADN plasmidiais extraídos foram diluídos 1:10 e utilizado 1 µL (~1-10 ng) de ADN na reação. A enzima empregada para a amplificação foi a “Biotools DNA Polymerase” (Biotools) e o protocolo utilizado está descrito no item 4.6.

As culturas que apresentaram clones recombinantes foram armazenadas em glicerol 25% a -70°C.

4.9. Sequenciamento nucleotídico

Os plasmídeos recombinantes purificados e quantificados pela metodologia de “Qubit dsDNA HS Assay kit” (Life Technologies) foram sequenciados a fim de verificarmos a integridade dos genes clonados. Para as reações de seqüenciamento foi utilizada a metodologia “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Ambas as fitas foram seqüenciadas para resolver compressões e ambigüidades. Os genes foram sequenciados com oligonucleotídeos iniciadores T7 (senso e anti-senso) e os oligonucleotídeos iniciadores (senso e anti-senso) específicos.

O seqüenciamento e a leitura automática das seqüências foi realizado utilizando o sequenciador “ABI PRISM[®] XL3500 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, Life Technologies).

Para a análise das seqüências obtidas, em comparação com as seqüências dos genes de pneumococos, foi utilizado o programa “SeqManII versão 5.05” (DNASTar, Inc.) para alinhamento entre as seqüências. Ambas as fitas foram seqüenciadas para resolver compressões e ambigüidades, bem como as análises em duplicatas produzidas de duas ampliações separadas forneceu segurança com relação à fidelidade do produto do sequenciamento.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento estão descritos na Tabela 4.6.1.

4.10. Expressão e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3)

Os plasmídeos recombinantes, para cada um dos genes clonados de pneumococos,

foram inseridos, separadamente, por eletroporação, em células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 Star (DE3) de acordo com o protocolo descrito no item 4.7, sendo utilizado ~30-100 ng (1 μ L) de ADN plasmidial para transformar 100 μ L de células competentes. Os clones foram selecionados em meio LB ágar contendo o antibiótico de seleção ampicilina. Um total de duas colônias, para cada clone recombinante, foram selecionadas e cultivadas em caldo TB contendo o antibiótico de seleção por 6-7 h, a 37°C sob agitação de 200 rpm. A seguir os clones recombinantes foram armazenados em glicerol 25% a -70°C.

Para verificarmos a expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes, alíquotas dos clones de *E. coli* BL21 Star (DE3), congeladas em glicerol, foram descongeladas e inoculadas 1:1.000 em 5 mL de caldo TB, contendo antibiótico, e cultivados por 16-18 h, a 37°C sob agitação de 200 rpm (pré-inóculo). A seguir foi realizado inóculo de 1:50, a partir do pré-inóculo, em 10 mL de caldo TB contendo antibiótico e as culturas foram crescidas por 1-2 h sob as condições de temperatura e agitação acima descritas. A absorbância (Abs₆₀₀) foi medida no espectrofotômetro “Bionnate 3” (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e as culturas foram induzidas com 1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) quando atingiram Abs₆₀₀ 0,6-0,8. Após a indução as culturas foram mantidas por 4 h, sob agitação, nas temperaturas de 28°C ou 37°C (temperaturas de indução). Alíquotas de 500 μ L foram retiradas das culturas antes e após a indução, centrifugadas por 5 min a 20.000xg e os sedimentos bacterianos utilizados para a avaliação da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes.

Para a avaliação da expressão das proteínas recombinantes, os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em tampão de amostra para proteína na proporção de 25 μ L de tampão para cada Abs₆₀₀ 0,1 para cada mL de cultivo. O material foi fervido por 5 min e um volume de 10 μ L juntamente com tampão de amostra para proteína foi submetido a SDS-PAGE (Laemmli, 1970)¹³³ e corado por coloração empregando coomassie blue-R 250. Para essa coloração, os géis foram mantidos em 50 mL de solução A por 30 min, sob leve agitação, sendo a solução levemente aquecida, a seguir a solução foi trocada e o processo repetido por uma a duas vezes. Após a solução foi retirada e foram adicionados 50 mL da solução B contendo 1 mL da solução de azul de comassie, sendo a solução levemente aquecida e os géis mantidos sob leve agitação até a visualização das bandas. A seguir, os géis foram descorados empregando a solução descorante e documentados utilizando o aparelho “L-PIX-HE”.

Para a avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes expressas, os sedimentos bacterianos obtidos após a indução, sob diferentes temperaturas, foram ressuspensos em tampão de lise (Tris base 20 mM, EDTA 1 mM) contendo ou não 0,1% do detergente triton X-100. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos nesse tampão na mesma proporção

acima descrita (em função da Abs_{600} da cultura), sonicados no “Microson Ultrasonic Cell disruptor” (Misonix, Farmingdale, NY, EUA) em 3 ciclos de 10 seg cada com amplitude de 30% e com intervalo de 30 seg entre cada ciclo, no gelo. Um volume de 150 μ L do material lisado foi centrifugado por 5 min a 20.000xg e o sobrenadante (proteínas solúveis) separados do sedimento (proteínas insolúveis). Ao sobrenadante foram adicionados 150 μ L de tampão de amostra para proteína 2X (ficando no final a concentração de 1X) e ao sedimento foram adicionados 150 μ L de tampão de amostra para proteína 1X. As amostras foram fervidas por 5 min e volumes de 10 μ L das proteínas insolúveis e 20 μ L das proteínas solúveis foram avaliadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

4.11. Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes expressas de forma solúvel e fusionadas a uma cauda de histidina na porção N-terminal foram purificadas pela cromatografia de afinidade utilizando IMAC com as colunas HisTrapTMHHP (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) de 1 ou 5 mL, utilizando o sistema ÄKTA Purifier 10 ou 100 (FPLC) (GE Healthcare Life Sciences).

Primeiramente, a purificação foi realizada com amostras preparadas de duas maneiras distintas, a partir dos sedimentos celulares provenientes de uma expressão de 4 h de cultivo a 28°C ou 37°C (dependendo da solubilidade de cada proteína expressa). Em um dos sedimentos bacterianos foi utilizada: a) solução de lise na presença ou não do detergente triton X-100 (dependendo da solubilidade da proteína a ser purificada) e b) solução de lise contendo 20 mM de imidazol na presença ou não do detergente; em cada um dos testes também foi adicionado o inibidor de protease “phenylmethylsulfonyl fluoride” (PMSF) na concentração final de 1 mM. As soluções de lise foram utilizadas para realizar a lise celular bem como para equilibrar a coluna (resina) utilizada na purificação.

As amostras contendo o tampão de lise foram lisadas por sonicação no “Microson Ultrasonic Cell disruptor” (Misonix) utilizando 3 ciclos com amplitude de 30% com um tempo de 30 seg de sonicação para cada mL de amostra, no gelo. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 20.000xg e o sobrenadante, contendo a proteína recombinante solúvel, aplicado na coluna (~20-40 mg de proteína total para a coluna HisTrapTMHHP 1 mL e ~ 150-200 mg para a coluna HisTrapTMHHP 5 mL). O material não ligado a matriz (eluato), foi recolhido para posterior análise. O material ligado à matriz foi lavado pela aplicação, na coluna, da mesma solução utilizada para o equilíbrio da resina e ligação da proteína. A seguir a proteína foi eluída com solução tampão PBS pH 7,4 empregando um gradiente de 30 volumes de coluna (VC) de 0 ou 20 mM a 1 M de imidazol. Após verificarmos em qual

concentração de imidazol as proteínas foram eluídas empregando gradiente de purificação, testamos diferentes etapas (“steps”) de purificação, exceto para as proteínas 02009 e 01929 para as quais obtivemos uma boa purificação proteica (rendimento e pureza) empregando apenas o gradiente. Na Tabela 4.11.1 descrevemos a metodologia empregada na purificação de cada uma das proteínas solúveis.

Tabela 4.11.1: Metodologia empregada na purificação das proteínas solúveis

Proteína	Metodologia de purificação*
00333	5 VC 20 mM; 2 VC 60 mM; 3 VC 300 mM; 6 VC 1 M
01909	5 VC 20 mM; 4 VC 60 mM; 4 VC 300 mM; 6 VC 1 M
00265	5 VC 20 mM; 10 VC 40 mM; 3 VC 60 mM; 3 VC 300 mM; 5 VC 1 M
01065	5 VC 20 mM; 5 VC 40 mM; 3 VC 80 mM; 10 VC 300 mM; 10 VC 1 M 2 VC 20 mM; 2 VC 40 mM; 1 VC 80 mM; 3 VC 300 mM; 3 VC 1 M
00080	5 VC 20 mM; 10 VC 40 mM; 3 VC 60 mM; 10 VC 300 mM; 10 VC 1 M
00962	5 VC 20 mM; 5 VC 60 mM; 5 VC 80 mM; 6 VC 300 mM; 5 VC 1 M
02009 e 01929	gradiente de 0 e 20 mM a 1 M
02072	5 VC 20 mM; 5 VC 60 mM; 5 VC 80 mM; 6 VC 300 mM; 5 VC 1 M
02232	5 VC 20 mM; 5 VC 40 mM; 5 VC 80 mM; 10 VC 1 M

* volumes de coluna (VC) e concentração de imidazol utilizados no gradiente e nas etapas de purificação. As proteínas foram eluídas com imidazol na concentração de 300 mM, com exceção da proteína 02232 que foi eluída com 80 mM.

As amostras purificadas foram preparadas e submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE para avaliação de concentração, pureza e integridade (para pureza ver Anexo 6). A seguir os géis foram corados e documentados de acordo com o descrito no item 4.10. A concentração das proteínas também foi medida empregando a metodologia de ácido bicinchoninico (BCA) (Thermo Fisher Scientific ou Sigma-Aldrich) de acordo com as normas do fabricante.

4.12. Preparo dos antígenos para a produção dos anticorpos policlonais em animais

Após a purificação, as proteínas recombinantes foram dialisadas contra tampão PBS pH 7,4, na presença ou não de 0,005% de triton X-100 (dependendo da solubilidade de cada proteína), para permitir a retirada do imidazol. Para o processo foram utilizados os cassetes de diálise (“slide-A-lyzer dialysis cassetes”) (Thermo Fisher Scientific) sendo que os volumes de tampão de diálise e intervalos para as trocas foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Após dialisadas, as proteínas foram aliqüotadas e congeladas a -70°C. No momento do uso as proteínas foram descongeladas, centrifugadas e quantificados empregando a metodologia de BCA.

Os antígenos foram formulados na proporção de 0,2 mg de cada proteína para 2 mg de hidróxido de alumínio (Alhydrogel) (Brenntag, Frederikssund, Dinamarca) por um período de 16-18 h, a 4°C sob leve agitação. Após a formulação, os mesmos foram diluídos em PBS pH 7,4 e aos camundongos Balb/c-AN foi administrada dose 10 µg de proteína/0,1 mg de adjuvante. Foram realizadas três inoculações intramusculares, com intervalo de sete dias entre as doses (doses nos dias 0, 7 e 14). Sete dias após a terceira dose (dia 21) os animais receberam um “booster” (reforço) com as proteínas recombinantes pela via intraperitoneal na concentração de 10 µg. Três dias (dia 24) após o “booster” os animais foram sangrados via punção cardíaca.

Para a obtenção dos soros (contendo os anticorpos policlonais), os sangues dos animais foram mantidos a 37°C por 30-45 min e a seguir refrigerados a 4-8°C por pelo menos 30 min. Após a fase de coagulação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1.000xg a 10°C. Os soros obtidos foram alíquotados e estocados a -20°C.

Os testes em animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Animais (CEUA) sob o protocolo P-7/10-4, intitulado "Desenvolvimento de uma vacina brasileira contra *S. pneumoniae*", cuja licença é LW-2/11 (ver Anexo 7)

4.13. “Immunoblotting”

Reações de “immunoblotting” (“western blot” e “dot blot”) foram utilizadas para verificarmos a antigenicidade das proteínas recombinantes frente aos anticorpos policlonais gerados em camundongos, bem como para verificarmos a antigenicidade dessas proteínas frente a soros humanos (pacientes diagnosticados com meningite pneumocócica).

Para a técnica de “dot blot” foram utilizadas as concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 ng de proteínas recombinantes e diluições dos anticorpos policlonais variando de 1:100 a 1:51.200. Para a técnica de “western blot” foram utilizadas as concentrações de 500 e/ou 250 ng de proteínas recombinantes e diluições dos anticorpos policlonais variando de 1:100 a 1:51.200.

Para a técnica de “dot blot” as proteínas recombinantes purificadas, dialisadas e quantificadas foram diluídas em tampão PBS pH 7,4 e um volume de 5 µL pingado em membrana de nitrocelulose (Duralose – UVTM Membranes; Stratagene, La Jolla, CA, EUA) e estas secas a 37°C por cerca de 15-30 min. Para a técnica de “western blot” um volume de 10 µL das proteínas contendo concentrações de 500 e 250 ng de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese. Após as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose utilizando protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989)¹³⁰. Outra metodologia aplicada foi correr as proteínas recombinantes

em gel de poliacrilamida preparativo sendo, após a transferência, as membranas cortadas em tiras de 0,5 cm de modo a conter, em cada tira, cerca de 500 ng de proteína.

As membranas foram bloqueadas com 4% de leite desnatado diluído em PBS pH 7,4 contendo tween 20 0,05% (PBST) por um período de 16-18 h a 4°C. A seguir, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4, para retirada do excesso de leite e incubadas com os anticorpos primários (anticorpos policlonais produzidos em camundongos) diluídos em PBST contendo 0,25% de albumina bovina fração V (BSA) (PBSTB). As membranas foram incubadas com os anticorpos primários a temperatura ambiente (24-28°C) por um período de 2 h sob leve agitação e a seguir foram lavadas com PBST (quatro lavagens de 10 min cada). Os anticorpos secundários, anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo (ambos moléculas inteiras) produzidos em cabra e conjugados com fosfatase alcalina (A3687 e A3688, respectivamente) (Sigma-Aldrich) foram diluídos 1:30.000 em PBST e as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h, sob agitação leve. A seguir, foram realizadas novamente as lavagens, sendo três com PBST e uma com PBS pH 7,4, como descrito anteriormente. Após as lavagens, as membranas foram reveladas com solução reveladora “Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega).

Para verificarmos a antigenicidade das proteínas recombinantes frente aos soros humanos utilizamos a metodologia de “multi-antigen print immunoassay” (MAPIA), sendo as proteínas recombinantes impressas em membrana de nitrocelulose HiFlow 180 (Millipore, Milão, Itália) utilizando o equipamento “Automatic TLC Sampler 4” (CAMAG, Muttenz, Suíça) do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) (Bio-Manguinhos/Fiocruz). Cada tira da membrana foi impregnada com 200 ng de cada uma das proteínas recombinantes. Os tampões e a metodologia empregadas para bloqueio e incubação com os anticorpos, lavagens das membranas e revelação foram as mesmas descritas anteriormente. O soro humano foi diluído 1:200 e o anticorpo anti-IgG humano (específico para cadeia γ) produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (A3187) (Sigma-Aldrich) diluído 1:30.000. Os soros humanos foram pré-adsorvidos com 2,5% v/v de lisado de *E. coli* por um período de 30 min antes de serem incubados com as membranas contendo os antígenos.

4.14. Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos

Volumes de 50 μ L de suspensões bacterianas de pneumococos dos sorotipos 1 (cepa 525/00), 4 (cepa 729), 5 (cepa 617/00), 6B (cepa 793), 7F (cepa 800), 9V (cepa 724), 14 (cepa 722), 18C (cepa 845), 19F (cepa 720) e 23F (cepa 756) foram semeadas em meio TSA enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro por um período de 16-18h a 37°C em

presença de 5% de CO₂. A seguir a massa bacteriana das placas foi removida com 2 mL de PBS pH 7,4 contendo 3% de BSA (PBSB) e as células centrifugadas por 5 min a 16.000xg. O sedimento bacteriano foi lavado com 1 mL de PBSB e novamente centrifugado. As bactérias foram ressuspensas em 1 mL de PBSB e a Abs₆₀₀ foi ajustada para 0,3 (~10⁸ UFC/mL). Cada marcação foi realizada em tubo contendo 1 mL do cultivo bacteriano.

Inicialmente realizamos três etapas de padronização para esta técnica: a) determinação da melhor concentração de anticorpos primário e secundário a serem utilizados, b) determinação da melhor temperatura de incubação das amostras para a marcação com os anticorpos e c) determinação do melhor momento de inativação das amostras, ao início ou ao término da marcação.

Para determinarmos a melhor concentração dos anticorpos utilizamos o anticorpo policlonal monoespecífico anti-PsaA produzido em camundongo (anticorpo primário) nas diluições de 1:50 e 1:100 e o anticorpo anti-IgM+A+G de camundongo conjugado ao FITC (isocianato de fluoresceína) (anticorpo secundário) (F1010) (Sigma-Aldrich) nas diluições de 1:250, 1:500 e 1:1.000. Verificamos que a intensidade de fluorescência utilizando o anticorpo secundário conjugado nas diluições de 1:500 e 1:1.000 foi menor do que aquela observada quando utilizamos a diluição de 1:250. Para a diluição dos anticorpos policlonais não houve diferença em relação a intensidade de sinal obtido quando utilizamos o anticorpo diluído 1:50 ou 1:100, neste caso optamos por utilizar a diluição de 1:100 visando eliminar possíveis reações cruzadas advindas da utilização de uma alta concentração de anticorpo, além de a quantidade de soro disponível ser considerado um fator limitante. Assim, estabelecemos como sendo a melhor condição de reação aquela utilizando o anticorpo primário (anticorpo policlonal) na diluição de 1:100 e o anticorpo secundário conjugado na diluição de 1:250.

Em virtude das variações metodológicas descritas na literatura (Wizemann *et al.*, 2001; Gor *et al.*, 2005 e Shah *et al.*, 2006)^{113; 134; 135} em relação à temperatura de incubação das amostras com os anticorpos, em nosso estudo testamos ambas as temperaturas descritas nestes trabalhos (4°C e 37°C). Observamos que na temperatura de 37°C a intensidade de fluorescência detectada (marcação FITC+) foi maior do que a 4°C não havendo comprometimento em relação as marcações controles negativas utilizando as células incubadas apenas com o anticorpo secundário conjugado (sem anticorpo primário) ou com o soro pré-imune (soro de animal não imunizado). Assim sendo, escolhemos marcar as amostras na temperatura de 37°C.

Para determinarmos o melhor momento para a inativação das amostras com formaldeído 1% realizamos esta inativação antes ou após as marcações. Verificamos que a inativação das bactérias após realizadas as marcações foi melhor uma vez que nestas condições as células

apresentaram perfil menos granuloso do que na outra condição testada.

Os tubos contendo as suspensões bacterianas diluídas em PBSB foram mantidos em gelo por 15 min, a seguir o material foi centrifugado por 5 min a 16.000xg e o sobrenadante retirado. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 100 µL de PBSB contendo o anticorpo primário (anticorpos policlonais produzidos em camundongos) diluído 1:100, sendo o material incubado por 1 h a 37°C. A seguir, o material foi centrifugado, o sobrenadante retirado e o sedimento bacteriano lavado uma vez com 300 µL de PBS pH 7,4. Após a lavagem, o sedimento bacteriano foi ressuspense em 100 µL de PBSB contendo o anticorpo secundário conjugado anti-IgG+M+A marcado com FITC diluído 1:250, sendo o material incubado por 1 h a 37°C. A seguir, o material foi centrifugado e lavado de acordo com o descrito acima. Após a lavagem, as bactérias foram inativadas com 1 mL de formaldeído 1%, diluído em PBS pH 7,4 e incubadas por pelo menos 30 min a temperatura ambiente antes de serem realizadas as aquisições.

A análise citofluorimétrica foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo “BD FACSCalibur” (Becton & Dickinson), equipado com um laser de argônio (488 nm) e um laser diodo vermelho (635 nm), do LATED. A intensidade de fluorescência do FITC foi avaliada no canal FL1, filtro 530/30. As avaliações foram baseadas nos gráficos de tamanho e granulosidade e nos gráficos de intensidade de fluorescência para FL1. O protocolo de aquisição foi realizado utilizando o programa “CellQuest”, no FACSCalibur e as análises foram realizadas através do “FlowJo” (Tree Star Inc, Ashland, OR, EUA). Para cada amostra foram adquiridos no mínimo 15.000 eventos na região (“gate”) das células, excluindo, desta maneira, possíveis contaminantes. Os resultados foram expressos em percentual de células positivas expressando as proteínas pneumocócicas na superfície bacteriana obtida através dos histogramas de marcação para FL1.

Para verificarmos o percentual de células específicas marcadas positivamente, para cada uma das proteínas avaliadas, descontamos o percentual de células totais marcadas (FITC+), para cada proteína analisada, do percentual de células marcadas no controle negativo utilizando o soro pré-imune (possível marcação inespecífica).

4.15. Imunofluorescência indireta para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos

Para esta metodologia foi utilizado o sistema de lâminas de 8 poços da “Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System” (Thermo Scientific). As lâminas foram previamente tratadas com polilisina a fim de melhorar a fixação bacteriana na superfície da lâmina. Um volume de 300 µL de polilisina a 0,01% foi adicionado em cada poço da lâmina e a mesma

mantida a temperatura ambiente por 24 h, após este período o excesso de polilisina foi retirado e as lâminas utilizadas para o preparo da imunofluorescência indireta.

A amostra bacteriana SPN 5 617/00 foi cultivada em meio TSA enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro por um período de 16-18 h a 37°C na presença de 5% de CO₂. A seguir a massa bacteriana da placa foi removida com 2 mL de meio de cultivo THE e as células centrifugadas por 5 min a 16.000xg. O sedimento bacteriano foi lavado com 1 mL de meio THE e novamente centrifugado. As células bacterianas foram ressuspensas em 1 mL de meio THE e a Abs₆₀₀ foi ajustada para 0,3 (~10⁸ UFC/mL). Um volume de 200 µL (~ 2 x 10⁴- 2 x 10⁵ UFC) de cultivo bacteriano foi adicionado a cada poço e as lâminas foram incubadas por 1 h e 20 min a 37°C na presença de 5% de CO₂. A seguir o sobrenadante foi retirado e o material fixado com formaldeído 4% diluído em PBS pH 7,4 (volume de 400 µL adicionado por poço). O material foi incubado por 40 min a 37°C e o sobrenadante foi removido. Para o bloqueio foi adicionado, em cada poço, um volume de 200 µL de PBSB. O material foi incubado a 37°C por 1 h e 30 min, o sobrenadante foi retirado e os anticorpos policlonais específicos para cada proteína foram diluídos 1:100, em um volume de 200 µL de PBSB, e adicionados a cada poço. O material foi incubado por 1 h a 37°C, o sobrenadante foi retirado e o material foi lavado cinco vezes com 200 µL de PBS pH 7,4. A seguir, o material foi incubado com o anticorpo secundário conjugado anti-IgG+M+A marcado com FITC diluído 1:250 em PBSB por 1 h a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi retirado e lavado conforme descrito anteriormente. Ao término das lavagens, o material foi deixado secar por cerca de 15 min e a seguir a lâmina foi montada utilizando lamínula e antifade (“ProLong Gold antifade”) (Life Technologies). A lâmina montada foi mantida por 24 h a temperatura ambiente e a seguir foi vedada (lamínula presa na lâmina) utilizando esmalte incolor. As lâminas foram mantidas a -20°C e visualizadas em microscópio AxioImager m1 (Zeiss) (Thornwood, NI, EUA) do Laboratório de Ultra-Estrutura Celular (LUC)/Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz – Plataforma de Microscopia.

4.16. Ensaio de adesão e inibição da adesão celular

Para o ensaio de adesão celular foi empregada a metodologia de análise por citometria de fluxo utilizando as células eucarióticas A549, que são células epiteliais basais de adenocarcinoma alveolar humano e a amostra bacteriana SPN 5 617/00. As células A549 foram cultivadas em meio “minimum essential medium” (MEM; Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em presença de 5% de CO₂.

Para a realização do ensaio, as células foram tripsinizadas utilizando tripsina-EDTA na concentração de 0,25% (Sigma-Aldrich), a seguir lavadas com meio MEM e quantificadas,

utilizando-se 0,4% de azul de tripan, em câmara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemanha). A visualização das células foi realizada utilizando microscópio CKX31 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão). Uma concentração de 10^6 células foram utilizados para o teste. As bactérias, previamente quantificadas, foram descongeladas, incubadas com FITC (1 μ g/ml) por 60 min a 37°C em agitação leve para permitir a marcação. A seguir, as bactérias marcadas foram incubadas com as células A549 com multiplicidade de infecção (MOI) de 100 (10^8 bactérias) por 2 h, a 37°C em presença de 5% de CO₂. O material foi centrifugado a 1.500xg por 5 min, as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 gelado e o material foi fixado com 2% de formaldeído diluído em PBS pH 7,4. Para se estimar o número de bactérias que se ligaram às células A549, pneumococos marcados com FITC foram adquiridos no citômetro e foi determinada uma região (“gate”) designada como região de interesse no gráfico de “dot plot” de tamanho x granulidade, esta região foi selecionada de modo a excluir agregados bacterianos. A fluorescência bacteriana nesta região foi determinada e o índice médio de fluorescência (IMF) dos pneumococos associados às células A549 foi dividido pelo IMF das bactérias na região de interesse a fim de determinarmos o número estimado de bactérias associadas por célula (Hara-Kaonga & Pistole, 2007) ¹³⁶.

Para o teste de inibição de adesão, as células bacterianas marcadas com FITC foram diluídas em meio MEM e pré-tratadas com os anticorpos policlonais mono-específicos gerados em camundongos na diluição de 1:10. O material (bactérias+soros) foi incubado por 1 h a 37°C sob leve agitação. A seguir, as bactérias pré-tratadas com os anticorpos policlonais foram incubadas com as células A549 por um período de 2 h a 37°C, sob leve agitação. Ao final, as células foram fixadas com formaldeído conforme descrito acima. As aquisições e análises citofluorimétricas foram realizadas de acordo com o descrito no item 4.15.

4.17. ELISA para estudo da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular

Para os testes de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) placas de 96 poços de fundo chato (Nunc; Thermo Scientific) foram sensibilizadas com 100 ng de cada uma das proteínas de matriz extracelular: colágeno IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio (Sigma-Aldrich), diluídas em tampão de sensibilização por um período de 16-18 h a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBSB por 2 h a 37°C, o bloqueio foi retirado e a seguir as placas foram incubadas com 100 ng de cada uma das proteínas recombinantes de pneumococos, diluídas em tampão de bloqueio, por 1 h a 37°C. Após o material foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem PBST e incubadas com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal anti-HisTag-IgG produzido em camundongo –

H1029) (Sigma-Aldrich) diluído 1:3.000 em PBSB, por 1 h 37°C. As placas foram lavadas conforme descrito anteriormente e incubadas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-IgG de camundongo, molécula inteira, produzido em coelho – A9044) (Sigma-Aldrich) diluído 1:30.000 em PBSB. Após a incubação com o anticorpo secundário, as placas foram novamente lavadas e a reação foi revelada com a solução “SureBlue TMB Microwell peroxidase substrate” (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Maryland, EUA) por 10 min e interrompida pela adição de 2 N de ácido sulfúrico (H₂SO₄). As placas foram lidas em espectrofotômetro Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, CA, EUA) em Abs₄₅₀.

Foram realizados testes preliminares para verificarmos ligação inespecífica entre o anticorpo conjugado anti-IgG de camundongo, ligado à peroxidase, com as proteínas testes de pneumococos. Não foram detectadas reações inespecíficas sendo estas leituras consideradas como sendo o branco. Um total de três experimentos independentes foram realizados sendo que para o cálculo do “cut off” subtraímos a leitura média de Abs₄₅₀ do controle negativo da leitura média obtida do branco, a seguir a este valor somamos duas vezes o desvio padrão.

4.18. Avaliação do grau de identidade nucleotídica e aminoacídica dos alvos entre amostras de pneumococos isolados no Brasil e análises filogenéticas

No Anexo 5 estão descritas as amostras de pneumococos para as quais os genes amplificados neste estudo foram sequenciados. A identidade nucleotídica entre as sequências gênicas dos alvos avaliados, a partir dos dados disponíveis no “GenBank” e daqueles gerados pelo sequenciamento das amostras de clones de origem clínica do Brasil, foi avaliada utilizando-se “blastn” (“basic local alignment search tool for nucleotide”), sendo as sequências gênicas de SPN 5 617/00 utilizadas como sequências de entrada. As sequências gênicas foram traduzidas em sequências aminoacídicas utilizando o programa “BioEdit v7.2.0” (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/>), sendo este programa também utilizado para gerar as matrizes de identidades nucleotídica e aminoacídica. As sequências nucleotídicas e aminoacídicas foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE (“MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation”) (Edgar, 2004)¹³⁷.

Para as análises filogenéticas utilizamos o programa “MEGA 5.2” (www.megasoftware.net) empregando a análise filogenética de máxima verossimilhança. As árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas e aminoacídicas foram construídas utilizando os modelos Tamura-Nei e Jones-Taylor-Thornton, respectivamente. Para avaliarmos a confiabilidade dos ramos foram geradas 100 replicatas de “bootstrap”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O advento do seqüenciamento dos genomas de diversos patógenos tem revolucionado os métodos pelos quais os organismos estão sendo estudados, e tem aumentado as expectativas em relação à capacidade de prever potenciais alvos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, biofármacos e vacinas. Em paralelo com os avanços da biologia molecular e das modernas tecnologias de sequenciamento, as análises dos dados gerados utilizando ferramentas de bioinformática têm permitido a seleção “in silico” de potenciais alvos vacinais para patógenos, incluindo vírus, bactérias, protozoários entre outros (Nowak, 1995; Baltz *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1998; Wizemann *et al.*, 2001; Gamberini *et al.*, 2005; Barocchi *et al.*, 2007; Rinaudo *et al.*, 2009; Seib *et al.*, 2009; Sette e Rappuoli, 2010; John *et al.*, 2012; Delany *et al.*, 2013; Oprea e Antohe, 2013; Simionatto *et al.*, 2013; Xiang, 2013)^{50; 89; 106; 107; 108; 109; 111; 113; 138; 139; 140; 141; 142; 143}. Essa nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas é conhecida como vacinologia reversa (Rappuoli, 2000)¹⁴⁴ e foi primeiramente aplicada no desenvolvimento de vacina contra *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B (Pizza *et al.*, 2000)¹⁰⁵.

Proteínas de superfície em bactérias gram positivas desempenham uma importante função na aderência do patógeno à célula hospedeira e frequentemente são necessárias para a virulência (Boekhorst *et al.*, 2005)¹⁴⁵. Diversos estudos têm sido realizados com o patógeno *S. pneumoniae* na busca de proteínas candidatas vacinais (Darrieux *et al.*, 2013; Miyaji *et al.*, 2013)^{61; 62}. As técnicas de busca baseiam-se na utilização da vacinologia reversa, como por exemplo, a identificação de proteínas associadas a parede celular e que apresentam o motivo LPxTG (Leu-Pro-qualquer aminoácido-Thr-Gly) presente na porção carboxi terminal das proteínas de bactérias gram+, essa sequência é reconhecida por enzimas sortases, as quais estão envolvidas no mecanismo de ancoramento das proteínas de superfície (Navarre & Schneewind, 1999)¹⁴⁶. Devido a isso as proteínas contendo esse motivo estão entre aquelas rotineiramente seleccionadas em projectos de vacinologia reversa em bactérias gram+ (Donati e Rapuolli, 2013)¹⁰³. Além da identificação das proteínas contendo este motivo, a vacinologia reversa também se baseia na identificação de proteínas que apresentem peptídeo sinal, sítios ligadores de colina entre outros (Wizemann *et al.*, 2001; Boekhorst *et al.*, 2005)^{113; 145}.

Além destas abordagens, outras também têm sido aplicadas, como por exemplo a identificação de proteínas capazes de serem reconhecidas por células B do sistema imune através da metodologia de biblioteca de “λ display” (Beghetto *et al.*, 2006)¹⁴⁷ e a identificação de proteínas a partir do secretoma bacteriano (Choi *et al.*, 2012)¹¹⁵.

Assim, no presente estudo empregamos a abordagem da vacinologia reversa pan-genômica, termo definido no trabalho de (Talukdar *et al.*, 2014)¹¹⁰ na busca por proteínas

conservadas entre os diferentes sorotipos de pneumococos e que apresentassem predição para localização na superfície bacteriana. Os genes selecionados foram clonados, expressos e as proteínas recombinantes purificadas e a seguir caracterizadas “in vitro”. Além disso verificamos a presença e o grau de conservação dos alvos selecionados entre amostras de isolados clínicos de pneumococos do Brasil.

5.1 Sequenciamento e anotação do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 5 cepa 617/00

O genoma de SPN 5 617/00 foi sequenciado e montado conforme descrito no item 4.1. Foram produzidos 197 sequências contíguas resultantes da sobreposição de sequências de ADN obtidas no sequenciamento, totalizando 2.048.257 pb, com um N50 de 34.408, considerando as sequências contíguas maiores do que 500 pb. Um total de 2.028 sequências aminoacídicas foram identificadas na anotação utilizado o programa GLIMMER, assim como 42 genes codificando ARN transportadores englobando todos os 20 aminoácidos foram identificados utilizando o programa tRNAscan-SE 1.21. Tendo em vista que esse sequenciamento não é capaz de realizar o fechamento de todo o genoma, ou seja, pequenas regiões representadas por Ns (sequências incompletas) ficam descobertas, faz-se necessária a realização de metodologias complementares de sequenciamento. Os genomas sequenciados pelas novas metodologias e que não apresentam o seu genoma completamente sequenciado são denominados projetos WGS.

Na Tabela 5.1.1. a seguir são demonstradas algumas das características do genoma de SPN 5 617/00 em relação ao tamanho do genoma, número de genes e de proteínas anotadas, assim como conteúdo de GC em comparação com alguns outros genomas completo depositados no “GenBank” em Abril de 2009. Verificamos que os dados descritos para SPN 5 617/00 são bastante similares àqueles descritos para as demais cepas.

Tabela 5.1.1: Descrição das características: tamanho do genoma, número de genes e de proteínas anotadas e conteúdo de GC em amostras de *Streptococcus pneumoniae* em comparação com o sorotipo 5 cepa 617/00.

TaxID ¹	Organismo	Tamanho do genoma em pb ²	Número de genes anotados	Número de proteínas anotadas	Conteúdo de GC (%)	Acesso no GenBank
189423	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 670-6B	2.240,045	2.430	2.352	40	CP002176
488221	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 70585	2.184,682	2.323	2.202	39,7	CP000918
574093	<i>Streptococcus pneumoniae</i> AP200	2.130,580	2.284	2.216	ND ³	CP002121
561276	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 700669	2.221,315	2.224	1.990	39,5	FM211187
516950	<i>Streptococcus pneumoniae</i> CGSP14	2.209,198	2.276	2.206	39,5	CP001033

373153	<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	2.046,115	2.069	1.914	39,7	CP000410
512566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> G54	2.078,953	2.186	2.114	39,7	CP001015
487214	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6	2.245,615	2.402	2.155	39,6	CP000936
869269	<i>Streptococcus pneumoniae</i> INV104	2.100	ND	ND	ND	FQ312030
869216	<i>Streptococcus pneumoniae</i> INV200	2.100	ND	ND	ND	FQ312029
488222	<i>Streptococcus pneumoniae</i> JJA	2.120,234	2.235	2.123	39,7	CP000919
869215	<i>Streptococcus pneumoniae</i> OXC141	2.000	ND	ND	ND	FQ312027
488223	<i>Streptococcus pneumoniae</i> P1031	2.111,882	2.254	2.073	39,7	CP000920
171101	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	2.038,615	2.115	2.042	39,7	AE007317
869311	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN032672	2.100	ND	ND	ND	FQ312039
869312	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN033038	2.100	ND	ND	ND	FQ312042
869303	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN034156	2.000	ND	ND	ND	FQ312045
869304	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN034183	2.000	ND	ND	ND	FQ312043
869306	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN994038	2.000	ND	ND	ND	FQ312041
869307	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN994039	2.000	ND	ND	ND	FQ312044
525381	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TCH8431/19A	2.088,772	2.355	2.275	40,2	CP001993
170187	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	2.160,842	2.301	2.105	39,7	AE005672
487213	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Taiwan19F-14	2.112,148	2.205	2.044	39,8	CP000921
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 5 617/00	2.051,197	2.073	2.028	39,65	

¹TaxID – número de identificação taxonômica da espécie no banco de dados “GenBank”; ²pb – par de base; ³ND – não identificado

5.2 Montagem dos bancos de dados

Inicialmente, para a busca por proteínas ortólogas, utilizamos o programa “blastp”, sendo avaliadas como sequências de entrada as 2.028 sequências aminoacídicas das proteínas anotadas do genoma de SPN 5 617/00 e como alvo o banco de dados contendo as sequências aminoacídicas das proteínas pneumocócicas, englobando as 53.960 sequências das proteínas anotadas dos 26 genomas de pneumococos, sendo 11 genomas completos e 15 projetos WGS (incluindo-se aqui o WGS de SPN 5 617/00). Uma definição matemática (filtro) foi aplicado, assim, em nossa análise se a identidade de aminoácidos fosse maior do que 60% em uma região de sobreposição maior do que 70% do tamanho da proteína de referência, então consideramos que é a mesma proteína, caso haja uma mesma proteína que esteja fora destes parâmetros ela pode não ter sido detectada. Nesta análise inicial foram encontradas 997 proteínas ortólogas compartilhadas pelos 26 genomas de pneumococos. A seguir realizamos um segundo “blastp” a fim de identificarmos as proteínas presentes apenas em pneumococos. Nesta análise utilizamos como sequências de entrada as 997 sequências aminoacídicas das proteínas ortólogas encontradas em pneumococos e como alvo o banco de dados contendo as sequências aminoacídicas das proteínas estreptocócicas, englobando 123.970 sequências anotadas dos 60 genomas de *Streptococcus* sp. Após esta segunda análise, 159 proteínas presentes apenas em pneumococos, apresentando as características de identidade (60%) e sobreposição (70%) acima descritas, foram selecionadas.

No Anexo 8 encontram-se listadas as 997 proteínas ortólogas encontradas em pneumococos, estando destacadas (sublinhadas) as 159 proteínas encontradas apenas nos 26

genomas de *S. pneumoniae*. As demais proteínas foram encontradas em um ou mais genomas de *Streptococcus* sp., que não *S. pneumoniae*.

5.3. Análises “in silico” e seleção das proteínas

De um total de 159 proteínas identificadas em pneumococos, 151 foram analisadas “in silico” para a predição de presença de peptídeo sinal, região transmembrana, motivo “lipobox” (lipoproteína) e localização sub-celular, utilizando os programas de bioinformática descritos no item 4.4. Os programas utilizados para as análises das proteínas de pneumococos, bem como o número de proteínas classificadas dentro de cada uma das características avaliadas, são demonstrados no Anexo 9. Essas análises foram realizadas a fim de selecionarmos proteínas com predição para presença de peptídeo sinal e para localização sub-celular extracelular (de parte ou de toda a proteína). As 8 proteínas restantes não foram analisadas, uma vez que, sendo o genoma de SPN 5 617/00 um projeto WGS, há presença de regiões contendo sequências incompletas (Ns) impossibilitando definir para qual proteína os genes codificavam. Os genes não analisados foram: 02318, 00641, 01307, 01454, 01687, 01688, 01170 e 01171.

Os resultados obtidos para as análises “in silico” das 151 proteínas são demonstrados no Anexo 10. Os dados foram compilados em forma de tabela a fim de permitir uma melhor visualização.

Das 151 proteínas avaliadas pelos programas de bioinformática um total de 99 foram pré-selecionadas por apresentarem predição positiva para as características avaliadas e acima descritas. Esse valor (99 proteínas) significa que os genes codificando proteínas de superfície representaram, segundo as nossas análises, cerca de 4,8% do genoma de SPN 5 617/00 para o qual foram anotadas 2.028 proteínas. Esse percentual é similar aquele descrito no trabalho de Wizemann *et al.*, 2001¹¹³, no qual foram identificados possíveis candidatos vacinais baseados no uso do genoma bacteriano de uma cepa pneumocócica do sorotipo 4. Neste trabalho foram identificadas 2.687 fases abertas de leitura, sendo estas avaliadas quanto à predição para localização sub-celular de superfície. Um total de 130 genes (4,8%) foram identificados como sendo responsáveis por codificarem proteínas extracelulares, baseado na presença de sequência sinal SPase I e II, presença de sequência LPXTG, LPXAG, LPXTN para ancoramento na parede celular, presença de domínio ligadores de colina, homologia com fatores de virulência já descritos, domínios ligadores de integrina, entre outros. Por meio destas análises foi determinado que os genes codificando proteínas de superfície representam cerca de 4% do genoma de pneumococo avaliado, um percentual similar aquele previsto para outras bactérias.

Após a primeira avaliação, as 99 proteínas pré-selecionadas foram re-avaliadas e nesta nova análise descartamos as proteínas que demonstravam ser: proteínas integrais de membrana e proteínas que, mesmo apresentando peptídeo sinal e/ou região transmembrana, tinham o restante da porção proteica localizada internamente na bactéria (porção intracelular). Assim, um total de 20 alvos foram selecionadas para clonagem, expressão, purificação e caracterização.

A seguir exemplificamos os resultados obtidos para a análise da proteína 01909 (Vexp3) de SPN 5 617/00 utilizando os programas de bioinformática. Essa exemplificação serve de modelo para que o leitor tenha conhecimento de como os resultados gerados pelos programas são demonstrados. Nas figuras e tabelas a seguir apresentadas as identificações e nomes aparecem em inglês uma vez que foram mantidos os resultados originais gerados pelos programas.

Os seguintes programas de bioinformática foram utilizados para as análises “in silico” das proteínas:

a) “Phobius”, para predição da presença de regiões transmembrana e presença de peptídeo sinal. A Figura 5.3.1 ilustra o resultado obtido para a análise da proteína 01909.

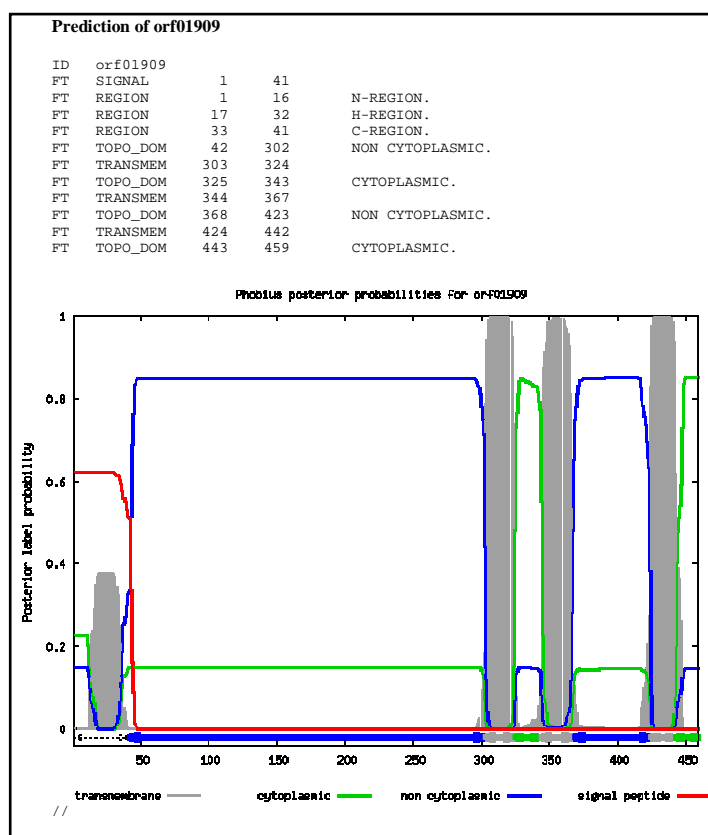


Figura 5.3.1: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Phobius”. As linhas em cinza indicam prováveis regiões transmembrana, a linha em verde as regiões citoplasmáticas, a linha em azul as regiões não citoplasmáticas e a linha vermelha a região de peptídeo sinal. A parte superior da figura indica os aminoácidos que fazem parte de cada uma

das regiões da proteína.

Para esta proteína verificamos que a mesma apresentou predição para presença de peptídeo sinal [aminoácidos (aa) 1-41], três prováveis regiões transmembrana (aa 303-324, 344-367 e 424-442), duas prováveis regiões citoplasmáticas (aa 325-343 e 443-459) e duas prováveis regiões não citoplasmáticas (aa 42-302 e 368-423), ou seja, expostas na superfície celular bacteriana. As linhas superiores e inferiores na figura representam a maior e menor probabilidade, respectivamente, para a presença das regiões indicadas na proteína. No eixo dos x é demonstrado o tamanho, em aa, da proteína.

b) “SignalP 3.0 Server”, para predição da presença de peptídeo sinal e da presença e localização do sítio de clivagem do peptídeo sinal. A Figura 5.3.2 ilustra o resultado obtido para a análise da proteína 01909.

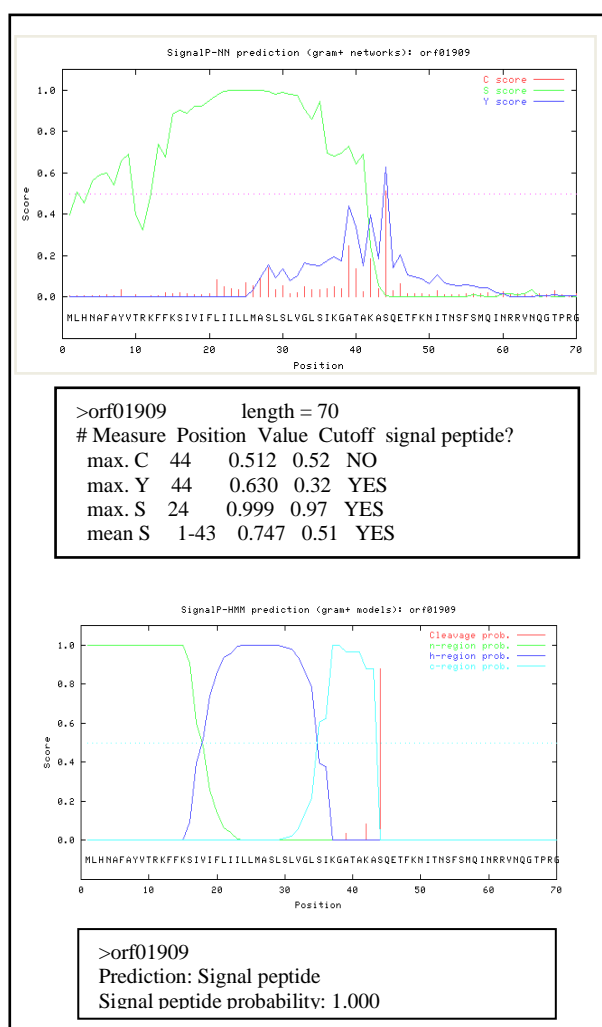


Figura 5.3.2: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “SignalP 3.0 Server”. Análise da região amino terminal da proteína 01909. Na figura superior “S score” (linha verde) mostra a probabilidade de um aminoácido estar presente no peptídeo sinal, “C score”

(linha vermelha) e “Y score” (linha azul) mostram o provável começo da proteína. Na figura inferior é demonstrado o provável sítio de clivagem do peptídeo sinal.

Para esta proteína verificamos que a mesma apresenta predição para presença de peptídeo sinal (aa 1-43 - probabilidade de 100%), sendo a região de clivagem deste peptídeo entre os aa 43-44 (probabilidade de 88%). “Mean S” significa a média “S-score” (score de discriminação) da possibilidade de presença do peptídeo sinal e “D-score” é o resultado utilizado para discriminar peptídeo sinal de não-peptídeo sinal.

c) “SOSUISignal” para predição de estrutura secundária de proteínas de membrana e predição de presença de peptídeo sinal. A Figura 5.3.3 ilustra o resultado obtido para a análise da proteína 01909.

Query title : 01909
 Total length : 459 A. A.
 Average of hydrophobicity : 0.051634

**This amino acid sequence has no signal peptide.
 This amino acid sequence is of a MEMBRANE PROTEIN
 which has 4 transmembrane helices.**

No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	15	KSIVIFLIILLMASLSLVGLSIK	37	Primary	23
2	302	NLLFWGSLSFVLLLALLLSLW	323	Primary	22
3	337	IGLKQASILGQFITESILIAIPA	359	Primary	23
4	423	DFIIIFVLALVLVVLVMALASSN	445	Primary	23

Figura 5.3.3: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “SOSUISignal”. O programa indica não haver presença de peptídeo sinal e haver presença de quatro hélices transmembranas, caracterizando ser uma proteína de membrana. O número de hélices é indicada à esquerda na figura com os números de 1 a 4, a seguir vem descrito, da região N-terminal para a C-terminal da proteína, a localização do aminoácido na qual a região transmembrana inicia e termina, o tipo de região transmembrana (no caso primária) e o tamanho (em aminoácidos) da região (lado direito da figura).

Para esta proteína verificamos que a mesma apresenta predição para localização de membrana, com quatro prováveis regiões transmembrana (aa 15-37, 302-323, 337-359 e 423-445), e não apresenta peptídeo sinal.

d) “TMHMM Server v. 2.0”, para predição de presença de hélices transmembranas nas proteínas. A Figura 5.3.4 ilustra o resultado obtido para a análise da proteína 01909.

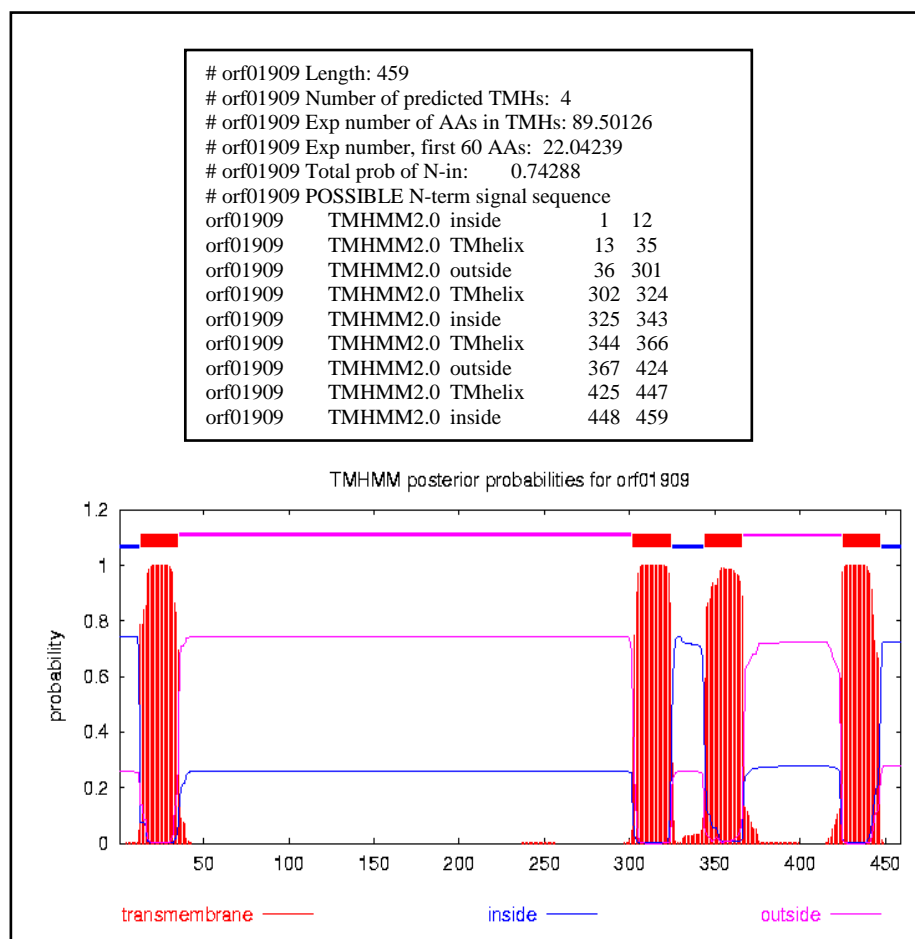


Figura 5.3.4: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “TMHMM Server v. 2.0”. As linhas em vermelho indicam prováveis regiões transmembrana, as linhas em azul as regiões citoplasmáticas, as linhas em rosa as regiões não citoplasmáticas. A parte superior da figura indica o número de regiões transmembrana e as posições dos aminoácidos que fazem parte de cada uma das regiões da proteína.

Para esta proteína verificamos que a mesma apresenta predição para presença de quatro prováveis regiões transmembrana (aa 13-35, 302-324, 344-366 e 425-447), duas prováveis regiões não citoplasmáticas (“outside”) (aa 36-301 e 367-424), três prováveis regiões citoplasmáticas (“inside”) (aa 1-12, 325-343 e 448-459) e presença de peptídeo sinal.

e) “Psortb v3.0.2”, para predição da localização sub-celular das proteínas. A Tabela 5.3.1 ilustra o resultado obtido na análise da proteína 01909.

Tabela 5.3.1: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Psortb v3.0.2”

SeqID	orf01909
CMSVM+ (cytoplasmic membrane)	CytoplasmicMembrane
CWSVM+ (cell wall)	Unknown
CytoSVM+ (cytoplasm)	Unknown
ECSVM+ (extracellular)	Unknown
Profile+_Localization	Unknown
Profile+_Details	No matches to profiles found
SCL-BLAST+_Localization	Unknown
SCL-BLAST+_Details	No matches against database
Signal+_Details	Signal peptide detected
Cytoplasmic Score	0.00
CytoplasmicMembrane Score	10.00
Cellwall Score	0.00
Extracellular Score	0.00
Final_Localization	CytoplasmicMembrane
Final_Score	10.00

Para esta proteína verificamos que a mesma apresenta predição para localização sub-celular de membrana citoplasmática e provável presença de peptídeo sinal (marcados nos quadrados em vermelho).

f) “Pred-Lipo”, para predição de lipoproteínas e presença de peptídeo sinal secretório em bactérias gram positivas. A figura 5.3.5 ilustra o resultado obtido para a análise da proteína 01909.

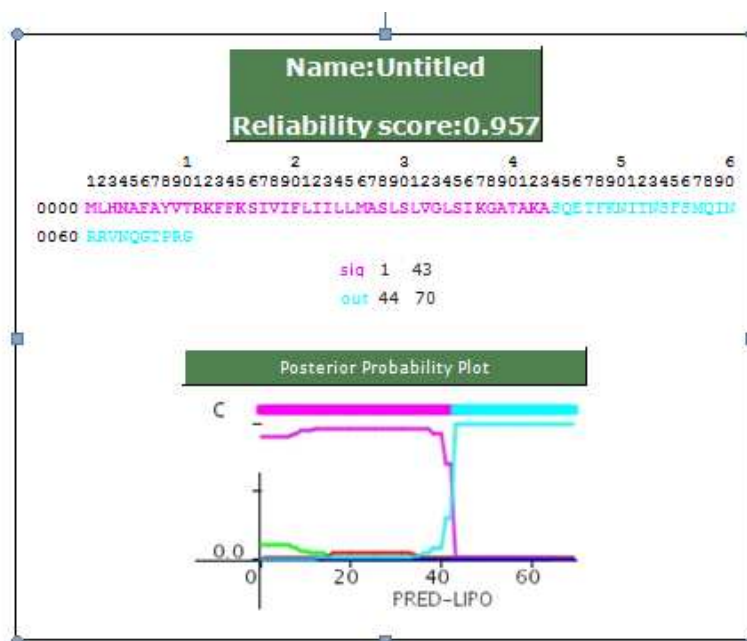


Figura 5.3.5: Avaliação da proteína 01909 utilizando o programa “Pred-Lipo”. A presença de peptídeo secretório é indicado pela linha e pelos aminoácidos marcados em rosa na figura.

Para esta proteína verificamos que a mesma apresenta alta probabilidade (“score” de

0,957) para presença de peptídeo sinal secretório (aa 1-43).

De acordo com os resultados gerados pelos programas de bioinformática utilizados, para a proteína 01909, verificamos que os programas demonstraram algum grau de divergência em relação a determinadas características proteicas avaliadas, como por exemplo, para a predição da presença de peptídeo sinal. Para a proteína analisada, os programas “Phobius”, “SignalP” e “Psortb” indicam haver predição para presença de peptídeo sinal, ao passo que no programa “SOSUISignal” não. Uma observação é em relação aos dados de localização celular fornecidos pelos programas “Psortb v2.0.4. e v3.0.2”, que divergiram para algumas das proteínas analisadas (ver Anexo 10). O programa “Psortb v3.0.2” (Yu, 2010) ¹²⁸ apresenta algumas melhorias em relação à v2.0.4 (Gardy, 2005) ¹²⁷ como por exemplo: predição de localização de proteínas em bactérias para as quais a coloração de Gram não reflete as estruturas clássicas (bactérias gram- que não apresentam membrana externa e gram+ com membrana externa); predição para localização de sub-categorias foram adicionadas, como por exemplo, predição de proteínas que fazem parte de aparato flagelar, fímbrias, sistema de secreção tipo III; os motivos sofreram atualização e aqueles que não eram 100% específicos foram removidos, entre outros.

Assim, com base nas características fornecidas pelos programas de bioinformática utilizados, das 151 proteínas de pneumococos analisadas, 99 foram pré-selecionadas (proteínas sublinhadas no Anexo 10) por apresentarem predição positiva, em pelo menos um dos programas descritos, para: a) presença de peptídeo sinal (“Psortb”, “SignalP”, “SOSUISignal”, “Phobius” e “Pred-Lipo”), b) localização sub-celular extracelular, de parede celular ou de membrana citoplasmática (“Psortb”) e c) localização sub-celular de membrana citoplasmática ou serem lipoproteínas (“Pred-Lipo”, “SOSUI”, “Phobius”).

A seguir, estas 99 proteínas foram re-analisadas a fim de selecionarmos apenas aquelas que apresentassem região exposta à superfície celular. Para esta análise foram utilizadas as informações geradas pelos programas “Phobius”, “SOSUISignal” e “TMHMM”. Foram excluídas aquelas proteínas que apresentaram apenas regiões transmembrana (proteínas de membrana integral) (por exemplo a proteína 00063) e aquelas que, embora apresentando peptídeo sinal demonstraram predição para localização sub-celular citoplasmática. As proteínas que mesmo apresentando região (ões) transmembrana e/ou intracelular (es) mas que demonstraram alguma porção proteica com predição para localização sub-celular extracelular foram selecionadas (por exemplo, as proteínas 00062 e 00265).

A Figura 5.3.6 ilustra os exemplos expostos acima, demonstrando os resultados obtidos para a análise das proteínas 00062, 00265 e 00063 utilizando o programa “Phobius”.

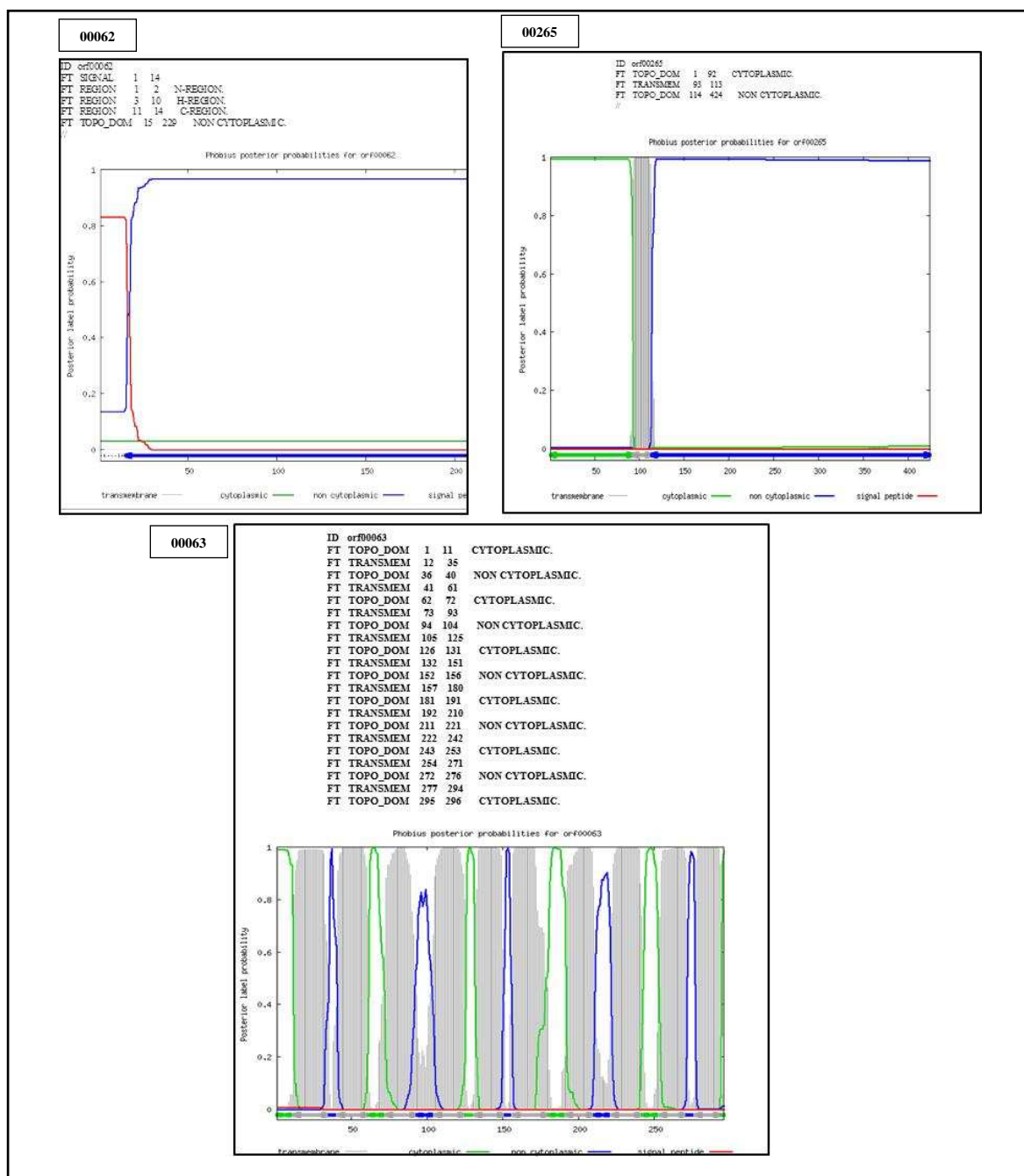


Figura 5.3.6: Avaliação das proteínas 00062, 00265 e 00063 utilizando o programa “Phobius”. A proteína 00062 apresenta predição para presença de peptídeo sinal (aa 1-14) e região extracelular (aa 15-229); a proteína 00265 apresenta uma região N-terminal citoplasmática (aa 1-92), seguida de uma região transmembrana (aa 93-113) e uma região C-terminal não citoplasmática (aa 114-224); a proteína 00063 apresenta diversas regiões citoplasmáticas, transmembranas e não citoplasmáticas alternadas (proteína integral de membrana).

Após esta re-análise, um total de 20 proteínas foram selecionadas para serem expressas em sistema *E.coli*. Para a amplificação dos genes que codificam as proteínas selecionadas foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos (ver Tabela 4.6.1)

de modo que apenas as regiões gênicas codificando as porções extracelulares das proteínas foram amplificadas.

Algumas das proteínas selecionadas estão descritas na literatura e apresentam papel biológico conhecido, enquanto que para outras até o momento não foi encontrada qualquer descrição, seja por ainda não terem sido estudadas ou por apresentarem nomes genéricos, impossibilitando uma busca mais refinada em relação à função desempenhada.

As proteínas selecionadas foram:

1. LicC (00062), uma fosfocolina citidiltransferase (“phosphocholine cytidyltransferase”), proteína membro da família das nucleosídeo trifosfato transferases (Rock *et al.*, 2001) ¹⁴⁸. O gene que codifica esta proteína faz parte de um operon englobando os genes *tarI*, *tarJ*, *licA*, *licB* e *licC*, sendo que LicB é uma proteína de membrana que importa colina e LicA e LicC ativam esta colina (Ebrhardt *et al.*, 2012) ¹⁴⁹. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que LicC é uma proteína citoplasmática, no entanto em nossas análises os programas “Phobius” e “SOSUISignal” indicaram que esta proteína apresenta peptídeo sinal e é não citoplasmática, sendo por este motivo selecionada para este estudo;
2. PiuA (02072), uma proteína ligadora de ferro (Brown *et al.*, 2001) ¹⁵⁰, capaz de proteger camundongos imunizados com a proteína recombinante contra desafio sistêmico e contra infecção respiratória (Brown *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2006) ^{70; 72}, além de gerar anticorpos que promovem a opsonização de pneumococos (Jomaa *et al.*, 2005) ¹⁵¹;
3. Psr (00265) um regulador transcricional da família LytR-CpsA-Psr (Hübscher *et al.*, 2008; Eberhardt *et al.*, 2012) ^{149; 152}. Essas proteínas desempenham um papel importante para a manutenção e retenção do polissacarídeo capsular na parede celular de pneumococo, assim como na divisão bacteriana, atuando como atenuadores transcricionais;
4. Uma histidina quinase (TCS11) (01065): proteína membro de um sistema bacteriano transdutor de sinal tipo 2-componentes que desempenham importantes funções permitindo detectar e eliciar respostas adaptativas que são cruciais para a sobrevivência e virulência dos patógenos. Esse sistema bacteriano compreende uma proteína de membrana que atua como um sensor histidina kinase e um componente citoplasmático regulador que se liga diretamente ao ADN e modula a expressão de genes que são necessários para a resposta fisiológica (Song *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013) ^{153; 154};
5. A proteína transmembrana Vexp3 (01909) componente de um sistema transportador

- ABC (“ABC transporter”) responsável pela secreção do Pep27, um peptídeo envolvido na autólise bacteriana. Estudos têm demonstrado que o locus *vex123-pep27-vncR*, está implicado na autólise bacteriana e na tolerância a vancomicina (Haas *et al.*, 2004) ¹⁵⁵;
6. Uma lipoproteína da família da tiorredoxina (00962), grupo de proteínas que atuam como sistemas antioxidantes sendo extremamente importantes para a sobrevivência de microrganismos em resposta ao estresse oxidativo (Lu, 2013) ¹⁵⁶;
 7. Uma lipoproteína do tipo transportador ABC ligadora de glutamina (“glutamine ABC transporter substrate-binding protein”) (01929), importante na aquisição de glutamina do meio de cultura, sendo o metabolismo da glutamina essencial na fisiologia bacteriana. A glutamina é importante para a biossíntese de compostos nitrogenados e síntese de proteínas (Härtel *et al.*, 2011) ¹⁵⁷;
 8. CbpD (01967), uma mureína hidrolase produzida por células competentes e que aumenta a taxa de transferência gênica entre pneumococos crescendo em meio de cultura líquido, além disso essa proteína contribui para a lise celular, atuando em conjunto com a proteína LytC, outra mureína hidrolase (Kausmally *et al.*, 2005; Wei e Havarstein, 2012) ^{158; 159};
 9. CbpE (02232), uma proteína que hidrolisa resíduos de fosforilcolina presentes nos ácidos teicóico e lipoteicóico da parede celular de pneumococos e atua como importante receptor de plasminogênio humano (Attali *et al.*, 2008) ¹⁶⁰;
 10. Pbp3 uma D-alanil-D-alanina carboxipeptidase (“D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase”) (00397), que atua controlando a disponibilidade de peptidoglicano durante o processo de crescimento e divisão celular (Morlot *et al.*, 2004 e 2005) ^{161; 162}.

Dentre as proteínas selecionadas neste estudo para as quais não encontramos uma descrição mais detalhada na literatura temos proteínas ligadoras do tipo ABC transportador (“ABC transporter, ABC-binding protein”) e componentes permeásicos proteicos do tipo transportador ABC. Esses nomes são genéricos para proteínas e não sabemos em qual substrato elas agem. As demais proteínas selecionadas no estudo incluem: CbpC (02277), uma proteína de ligação de ATP do tipo transportador ABC (“ABC transporter, ATP-binding protein”) (00080 e 02118), o componente permeásico de uma proteína do tipo ABC que faz parte de um sistema de transporte de peptídeo antimicrobiano (“ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component”) (00333), CelB (00787), proteína de parede celular (02265), uma proteína necessária para a biossíntese de polissacarídeo (00589), o componente permeásico de uma proteína do tipo transportador ABC (“ABC transporter,

permease protein”) (01195), duas proteínas hipotéticas (00271 e 02009), sendo a 02009 uma lipoproteína.

Diversas proteínas têm sido descritas como potenciais candidatos vacinais baseados em estudos de vacinologia reversa, como exemplo podemos citar as proteínas LytB e LytC (Wizemann *et al.*, 2001) ¹¹³, NagA, PhtD, ZmpB, e Eno (Choi *et al.*, 2012) ¹¹⁵, PhtE, PhtD, PspA, CbpD e ZmpB (Beghetto *et al.*, 2006) ¹⁴⁷. Em nosso estudo verificamos que algumas proteínas, já descritas na literatura, como por exemplo, LicC (00062), CbpA (01307), CbpD (01967), CbpE (02232), PiuA (02072), Ply (00085), PavA (00800), LytA (01135) entre outras foram identificadas como estando presentes apenas em pneumococos (ver Anexo 8) seguindo-se os parâmetros (filtros) adotados (60% de identidade e 70% de sobreposição) descritas no item 4.3.

5.4. Amplificação dos genes por PCR

Através da técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos (ver Tabela 4.6.1) foi possível amplificar os 19 genes de pneumococos selecionados a partir do ADN genômico extraído de SPN 5 617/00. Apenas o gene *02118* não foi amplificado apesar de todas as condições e oligonucleotídeos iniciadores testados. Para todos os genes foram obtidas bandas únicas de amplificação.

A Tabela 5.4.1 descreve o tamanho original dos genes selecionados a partir do genoma de SPN 5 617/00 assim como o tamanho dos fragmentos que foram clonados no sistema pET100/D-TOPO, o tamanho das proteínas expressas e a (s) região (ões) retirada (s) das proteínas. A Figura 5.4.1 demonstra o resultado obtido para a amplificação dos genes *00080*, *00265*, *00271*, *00333*, *00589*, *00787*, *02265*, *01065*, *01195* e *01909* em diferentes condições conforme descritas no item 4.6. Os produtos de PCR foram confirmados quanto a sua amplificação e o tamanho esperado em gel de agarose.

Tabela 5.4.1: Tamanho original dos genes e dos fragmentos gênicos clonados e retirados, percentual do tamanho dos fragmentos gênicos retirados, tamanho das proteínas expressas e descrição da região retirada da proteína (região gênica não amplificada)

Gene em SPN 5 617/00	Tamanho original do gene (pb) ¹	Tamanho do fragmento gênico clonado (pb)	Tamanho do fragmento gênico retirado (pb)	Percentual do tamanho do fragmento gênico retirado	Tamanho da proteína expressa (kDa) ²	Descrição da região retirada da proteína (aa ³)
02277	1.020	933	87	8%	40,5	29 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
00271	1.035	348	687	66%	17,2	229 aa iniciais compreendendo regiões alternadas de porções não citoplasmáticas, transmembrana, citoplasmática
00962	567	501	66	12%	22,7	22 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
02009	570	513	57	10%	23,1	19 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
00062	690	648	42	6%	29,6	14 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
01065	1.098	651	447	41%	28,8	149 aa iniciais correspondendo a regiões alternadas de porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
00333	1.989	690	1.299	65%	30,4	clonagem da porção gênica compreendidos aa 307 a 536, sendo que as regiões iniciais e finais da proteína retiradas compreendem porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
01929	801	741	60	7%	31,6	20 aa iniciais compreendendo o peptídeo sinal
01909	1.380	798	582	42%	33,4	clonagem da porção gênica compreendidos aa 36 a 301, sendo que as regiões iniciais e finais da proteína que foram retiradas compreendem o peptídeo sinal e porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
00787	2.190	864	1.326	60%	36,4	442 aa iniciais compreendendo regiões alternadas de porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
02072	966	891	75	8%	36,3	25 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
00265	1.275	930	345	27%	38,3	115 aa iniciais compreendendo região alternada com porção citoplasmática e transmembrana
01967	1.119	999	120	11%	41,5	40 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
01195	2.553	1.098	1.455	57%	45,5	clonagem da porção gênica compreendendo aa 453 a 818, sendo que as regiões iniciais e finais da proteína retiradas compreendem porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
00397	1.242	1.239	3	-	49,2	retirada do ATG inicial ⁴
00080	1.560	1.557	3	-	63,6	retirada do ATG inicial ⁴
00589	1.851	1.434	417	22%	57,2	139 aa iniciais compreendendo regiões alternadas de porções citoplasmáticas, não citoplasmáticas e transmembrana
02232	1.896	1.818	78	4%	73,7	26 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal
02265	5.304	5.187	117	2%	196,1	39 aa iniciais correspondendo ao peptídeo sinal

¹pb – pares de bases; ²kDa – kilo dalton; ³aa – aminoácido; ⁴para a clonagem no vetor pET100/D-TOPO retira-se o ATG inicial uma vez que no vetor já é contemplado este códon de iniciação o qual está localizado na região que antecede a cauda de poli-histidina (região N-terminal da proteína).

A Figura 5.4.1 ilustra os resultados obtidos na padronização das condições da PCR para a amplificação dos genes *00080*, *00265*, *00271*, *00333*, *00589*, *00787*, *02265*, *01065*, *01195* e *01909* de pneumococos.

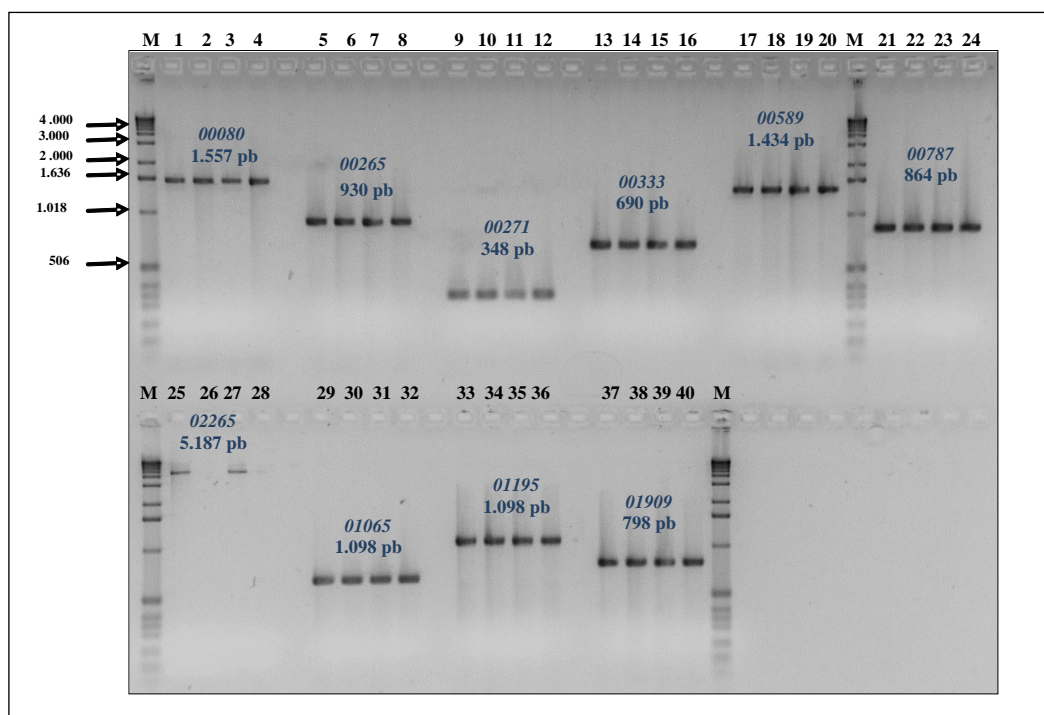


Figura 5.4.1: Análise, por eletroforese em gel de agarose 1%, dos produtos de PCR dos fragmentos gênicos de pneumococos. Os géis foram corados empregando “gelred”. M: padrão de tamanho de fragmento “1 Kb DNA ladder” (Life Technologies); 1 a 4: *00080*; 5 a 8: *00265*; 9 a 12: *00271*; 13 a 16: *00333*; 17 a 20: *00589*; 21 a 24: *00787*; 25 a 28: *02265*; 29 a 32: *01065*; 33 a 36: *01195*; 37 a 40: *01909*. Os genes amplificados e seus respectivos tamanhos em pb encontram-se descritos na figura.

5.5. Clonagem dos genes de pneumococos, obtenção dos clones recombinantes e sequenciamento

Após a obtenção dos insertos, os mesmos foram ligados ao ADN do vetor pET100/D-TOPO e a seguir os ADN recombinantes foram inseridos em *E. coli* TOP10 de acordo com o descrito no item 4.7. Obtivemos clones recombinantes para os 19 genes. Aqueles clones cujo ADN plasmidial apresentou perfil de banda eletroforética maior que a do ADN controle (vetor pET100/D-TOPO) foram selecionados e tiveram a presença do gene clonado confirmado por meio de PCR (Figura 5.5.1) e digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III de acordo com o descrito no item 4.8 (dados não mostrados).

A Figura 5.5.1 ilustra os resultados dos perfis eletroforéticos dos tamanhos dos genes amplificados a partir dos clones para as construções pET100/D-TOPO/*00787*, *01195*, *00265*, *00397*, *00589*, *00333*, *00271*, *02009*, *00962* e *00062*.

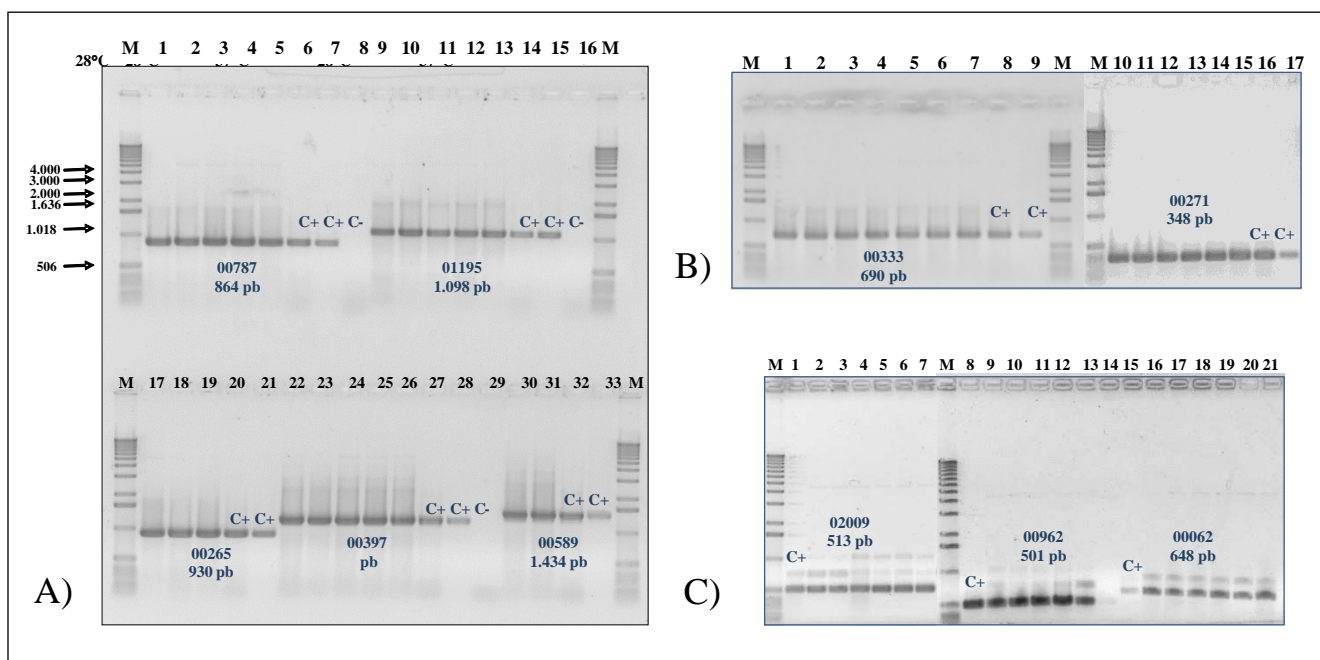


Figura 5.5.1: Análise, por eletroforese em gel de agarose 1%, dos produtos de PCR dos fragmentos gênicos de pneumococos - clones recombinantes. Os géis foram corados empregando “gelred”. **M**, padrão de tamanho de fragmento “1 Kb DNA ladder”; **A)** 1 a 5, clones de *00787*; 6 a 8, controles; 9 a 13, clones de *01195*; 14 a 16, controles; 17 a 19, clones de *00265*; 20 e 21, controles; 22 a 26, clones de *00397*; 27 a 29, controles; 30 e 31, clones de *00589*; 32 e 33, controles. **B)** 1 a 7, clones de *00333*; 8 e 9, controles; 10 a 15, clones de *00271*; 16 e 17, controles. **C)** 1, *02009* controle; 2 a 7, clones de *02009*; 8, *00962* controle; 9 a 14, clones de *00962*; 15, *00062* controle; 16 a 21, clones de *00062*. C-: controle negativo, reação de PCR sem a presença de ADN; C+: controle positivo, reação de PCR com o ADN de *S. pneumoniae* 5 617/00. Os genes amplificados e seus respectivos tamanhos em pb estão descritos na figura.

Todos genes selecionados foram amplificados e clonados com sucesso. Os clones correspondentes a cada construção foram submetidos ao sequenciamento e análise a fim de checar a fase de leitura e avaliar a identidade desses frente a sequência molde.

Para as análises dos seqüenciamentos utilizamos a seqüência referência da amostra SPN 5 617/00 e o programa “SeqManII versão 5.05”. Mais de um clone para cada um dos genes clonados foi analisado, sendo que alguns clones apresentaram mutações silenciosas e/ou não silenciosas em suas seqüências. Para a escolha do ADN a ser expresso, selecionamos, preferencialmente, clones que não continham mutações em suas seqüências. No entanto, isso não foi possível para as construções com os genes *00589* e *00080*, cujos clones avaliados apresentaram mutações não silenciosas. Nestes casos selecionamos os clones que apresentaram menor número de mutações. Na construção contendo o gene *00589* selecionamos um clone que apresentou mutação na posição 985 pb alterando a base nitrogenada de T para C, mudando o aminoácido de GTC (valina - apolar) para GCC (alanina

- apolar). No caso da construção expressando o gene *00080* selecionamos um clone que apresentou mutação na posição 393 pb alterando a base de A para G, mudando o aminoácido de ATT (isoleucina - apolar) para GTT (valina - apolar). Os números das bases mutadas nos alvos acima descritos referem-se às bases no tamanho do fragmento gênico que foi clonado, não refletindo a posição da base no tamanho original do gene. Para os demais genes clonados, os clones recombinantes selecionados para a expressão em *E. coli* apresentaram o gene íntegro, sem mutações e em correta fase de leitura.

5.6. Expressão e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3)

Um total de dois clones de *E. coli* BL21 Star (DE3), para cada ADN plasmidial recombinante gerado, foi selecionado. No entanto, foi realizada a expressão da proteína a partir de um dos clones, sendo o outro guardado caso a proteína não fosse expressa.

Os perfis eletroforéticos das proteínas recombinantes expressas foram analisados em gel de SDS-PAGE e os resultados são demonstrados na Figura 5.6.1.

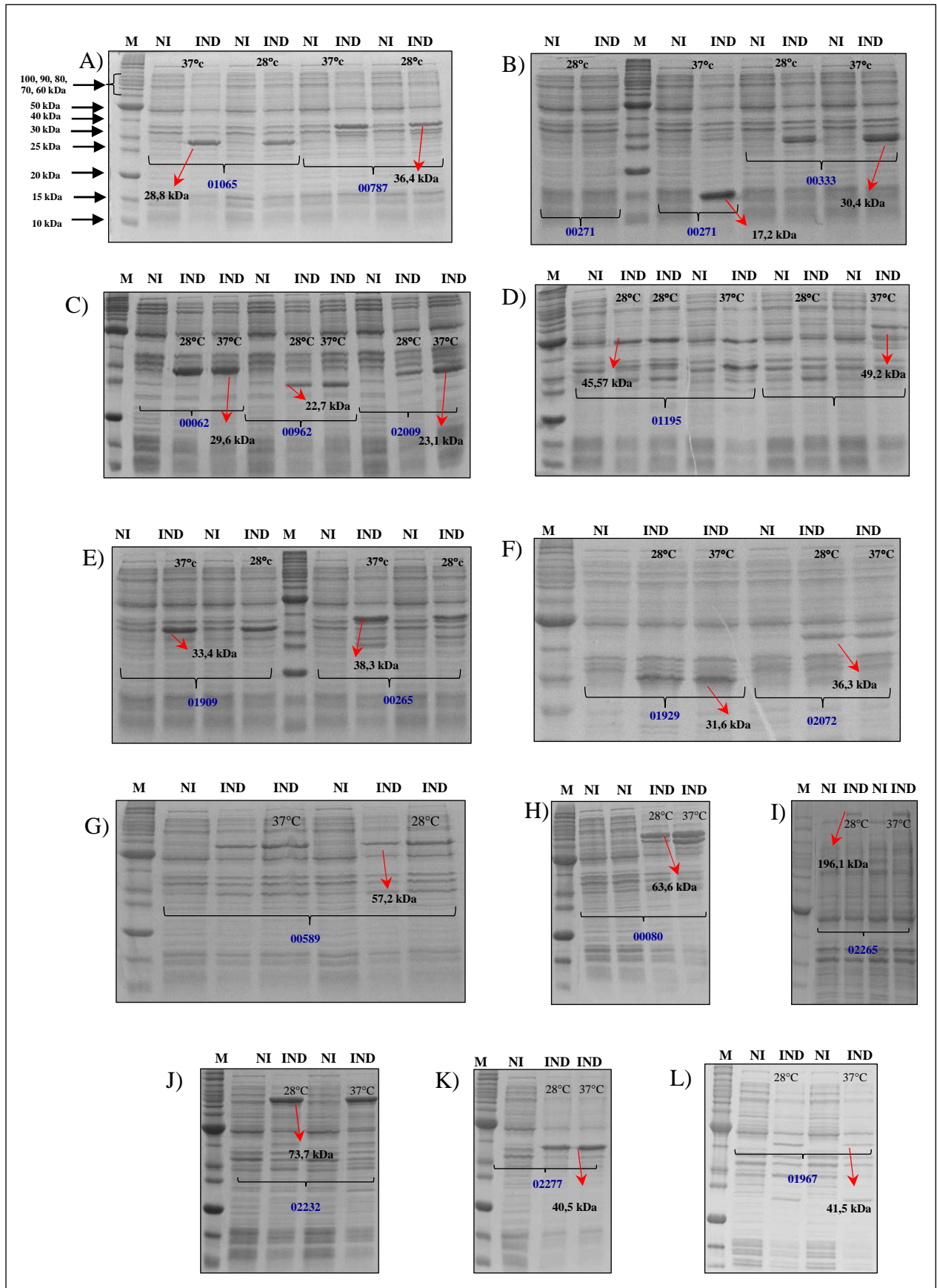


Figura 5.6.1: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, da expressão das proteínas recombinantes. Para a expressão as culturas de *E. coli* foram induzidas nas

temperaturas de 37°C e 28°C. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. **M**, marcador de peso molecular “Bench Mark Protein Ladder” (Life Technologies); **NI**, lisado de cultura de *E. coli* não induzida; **IND**, lisado de cultura de *E. coli* induzida a 28°C e 37°C. Expressão das proteínas: **A**) 01065 (28,8 kDa) e 00787 (36,4 kDa); **B**) 00271 (17,2 kDa) e 00333 (30,4 kDa); **C**) 00062 (29,6 kDa), 00962 (22,7 kDa) e 02009 (23,1 kDa); **D**) 01195 (45,5 kDa) e 00397 (49,2 kDa); **E**) 01909 (33,4 kDa) e 00265 (38,2 kDa); **F**) 01929 (31,6 kDa) e 02072 (36,3 kDa); **G**) 00589 (57,2 kDa), **H**) 00080 (63,6 kDa), **I**) 02265 (196,1 kDa); **J**) 02232 (73,7 kDa); **K**) 02277 (40,5 kDa); **L**) 01967 (41,5 kDa). Os tamanhos das proteínas expressas bem como as temperaturas de indução das culturas de *E. coli* para a expressão das proteínas recombinantes estão descritos na figura.

Através desta análise constatamos que todas as 19 proteínas foram expressas a 37°C. Contudo, para as construções 00271 e 00397 não foi possível visualizar a expressão, em SDS-PAGE, das proteínas recombinantes a 28°C. Para as demais proteínas expressas verificamos que, em ambas as temperaturas de indução testadas, não houve variação acentuada no nível de expressão. Além disso, verificamos que a banda da proteína expressa não é visualizada antes da indução da expressão (amostra não induzida), não havendo “vazamentos” na expressão, já que é utilizado o vetor de expressão pET100/D-TOPO o qual utiliza o promotor do bacteriófago T7 modificado para conter a sequência do operador *lac*, com o objetivo de controlar a expressão de genes heterólogos em *E. coli*. O operador *lac* serve como sítio de ligação do repressor codificado pelo gene *lacI*, o qual impede a ação da enzima T7 RNA polimerase (INVITROGEN, 2010)¹³¹. O gene codificante da enzima T7 RNA polimerase está localizado no cromossomo da cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli*, o qual apresenta os seguintes elementos: gene *lacI* que codifica o repressor LacI, o gene codificante da enzima RNA polimerase de T7 sobre o controle do promotor *lacUV5* e uma pequena porção do gene *lacZ*. O indutor IPTG é utilizado para inativar o repressor, dissociando-o do operador e permitindo assim, a transcrição do gene codificante da RNA polimerase de T7. Quando quantidade suficiente da enzima estiver disponível, a mesma liga-se ao promotor T7 contido no vetor e inicia a transcrição do gene de interesse. A cepa BL21 (DE3) Star apresenta deficiência nas proteases *lon* e *OmpT*, permitindo a redução da degradação das proteínas heterólogas expressas e uma mutação no gene *rne131*, codificante da RNase E privada de 477 aa na região C-terminal. Esta porção é responsável pela degradação de ARN mensageiro e sua retirada permite o aumento da estabilidade do mesmo, além do aumento do rendimento proteico (Terpe, 2006; INVITROGEN, 2010)^{120; 131}.

Após verificarmos a expressão das proteínas recombinantes, procedemos à análise da solubilidade destas proteínas. Para esta análise foram utilizados os sedimentos bacterianos provenientes das culturas cultivadas a 37°C e induzidas a 28°C ou 37°C, além disso utilizamos tampão de lise na ausência e presença do detergente não iônico triton X-100. Deste

modo analisamos a solubilidade das proteínas sob dois aspectos: a) expressão das proteínas recombinantes a temperaturas mais baixas (28°C), o que desfavorece a formação de corpos de inclusão (Vera *et al.*, 2007) ¹⁶³ e b) a utilização de detergente triton X-100 que favorece a solubilização das proteínas (Schnaitman, 1971) ¹⁶⁴. Inicialmente analisamos a solubilidade das proteínas recombinantes a 37°C utilizando tampão de lise na presença e ausência do detergente triton X-100. Se a proteína recombinante de interesse fosse insolúvel nestas condições a sua solubilidade seria avaliada a 28°C.

Os perfis eletroforéticos das proteínas recombinantes expressas de forma solúvel ou insolúvel são demonstrados nas Figuras 5.6.2, 5.6.3 e 5.6.4.

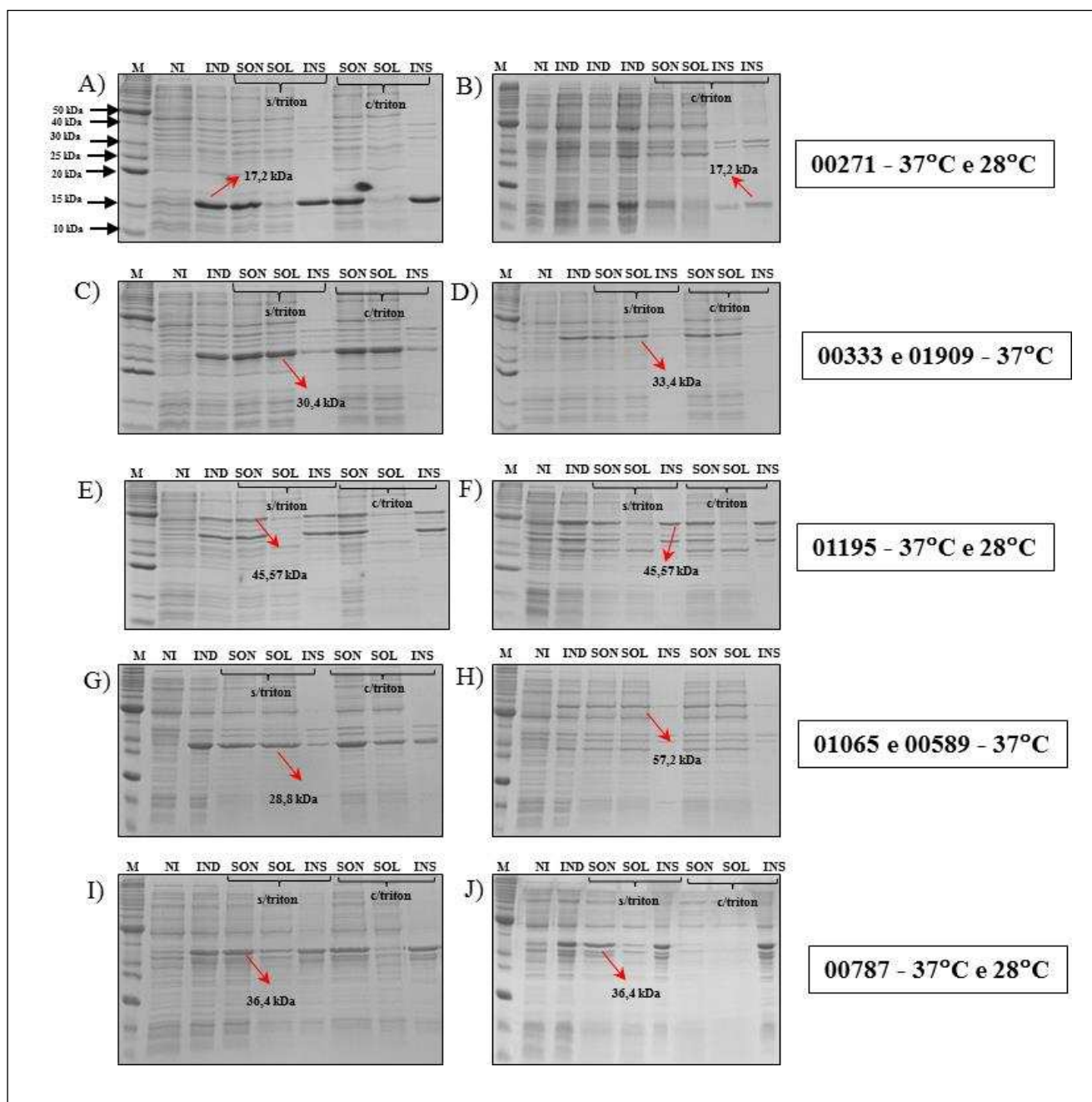


Figura 5.6.2: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% ou 15%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00271, 00333, 01909, 01195, 01065, 00589 e 00787. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. M, marcador de peso molecular “Bench Mark protein ladder”; NI, cultura de *E. coli* não induzida; IND, cultura de *E. coli* induzida a 37°C ou 28°C; SON, sonicação (lisado total sonificado de cultura de *E. coli* induzida); SOL, fração solúvel; INS, fração insolúvel; s/triton, sem detergente triton X-100 no tampão de lise; c/triton, com detergente triton X-100 no tampão de lise. **A e B**) 00271 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente); **C**) 00333 (solubilidade a 37°C); **D**) 01909 (solubilidade a 37°C); **E e F**) 01195 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente); **G**) 01065 (solubilidade a 37°C); **H**) 00589 (solubilidade a 37°C); **I e J**) 00787 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente). Os tamanhos das proteínas expressas estão descritos na figura.

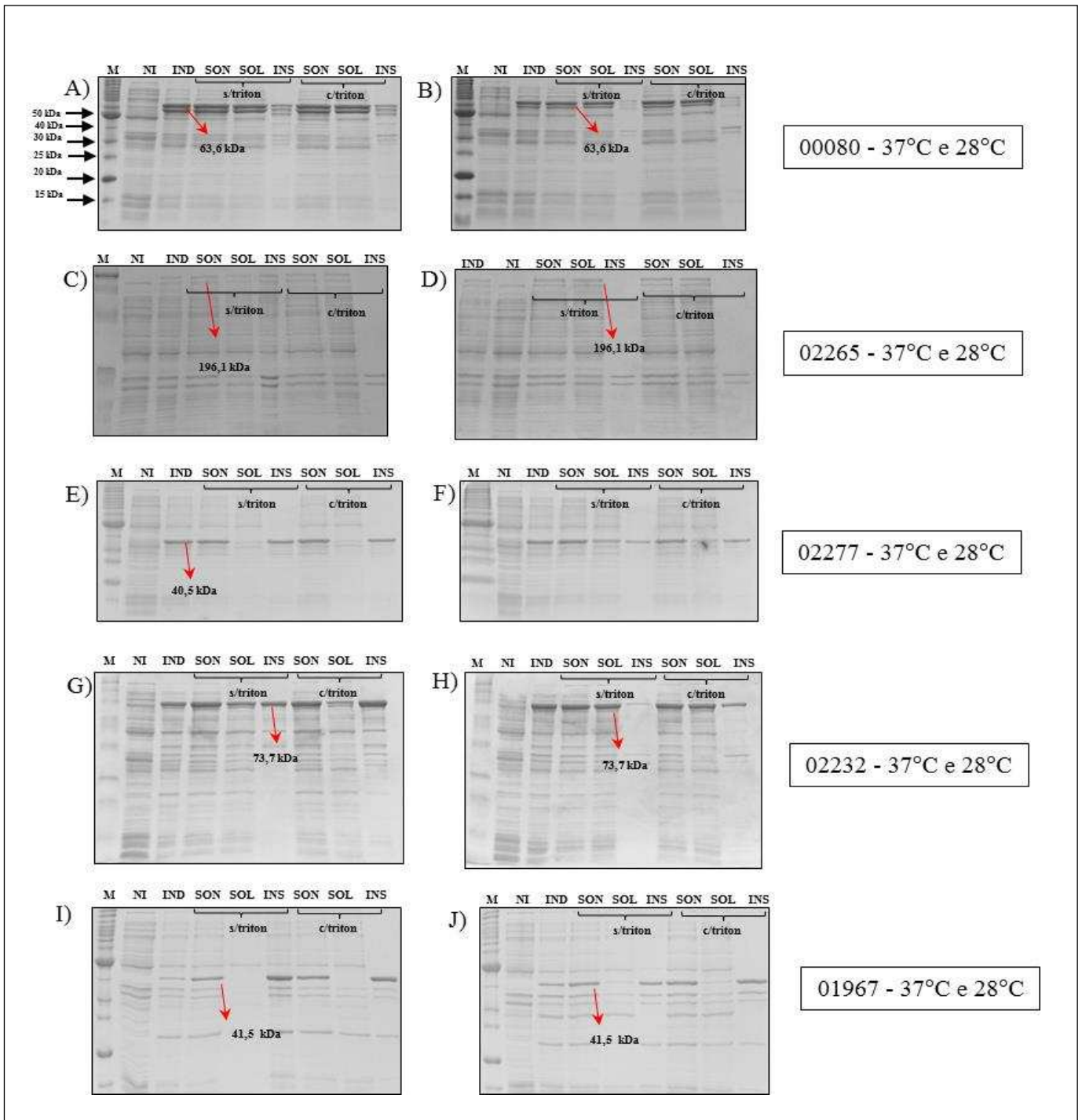


Figura 5.6.3: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00080, 02265, 02277, 02232 e 01967. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. **M**, marcador de peso molecular “Bench Mark protein ladder”; **NI**, cultura de *E. coli* não induzida; **IND**, cultura de *E. coli* induzida a 37°C ou 28°C; **SON**, sonicado (lisado total sonicado de cultura de *E. coli*, induzida); **SOL**, fração solúvel; **INS**, fração insolúvel; **s/triton**, sem detergente triton X-100 no tampão de lise; **c/triton**, com detergente triton X-100 no tampão de lise. **A e B**) 00080 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente); **C e D**) 02265 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente; **E e F**) 02277 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente; **G e H**) 02232 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente); **I e J**) 01967 (solubilidade a 37°C e 28°C, respectivamente). Os tamanhos das proteínas expressas estão descritos na figura.

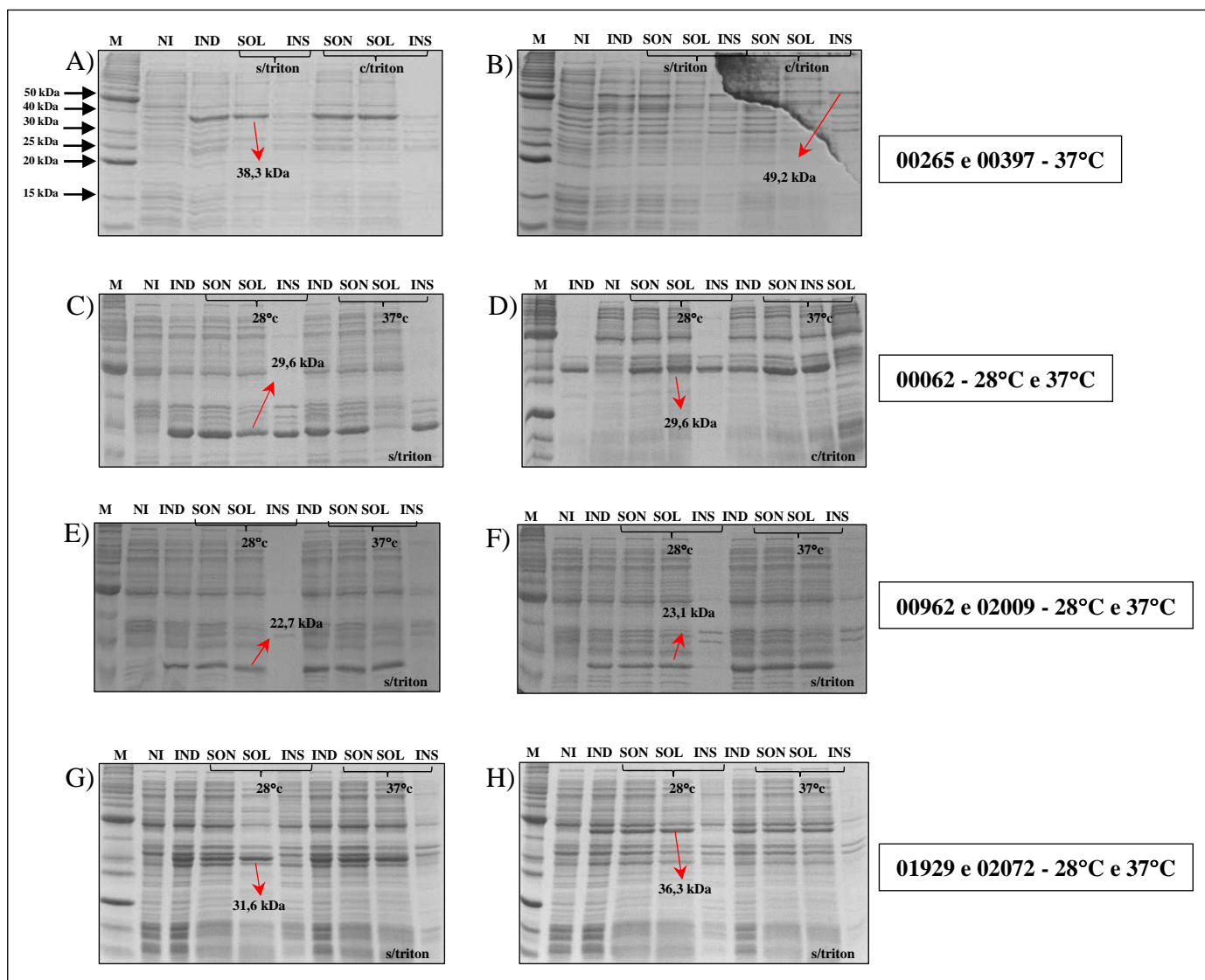


Figura 5.6.4: Análise, por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% ou 15%, da solubilidade das proteínas recombinantes 00265, 00397, 00062, 00962, 02009, 01929 e 02072. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. M, marcador de peso molecular “Bench Mark protein ladder”; NI, cultura de *E. coli* não induzida; IND, cultura de *E. coli* induzida a 37°C e 28°C; SON, sonicado (lisado total sonicado de cultura de *E. coli* induzida); SOL, fração solúvel; INS, fração insolúvel; s/triton, sem detergente triton X-100 no tampão de lise; c/triton, com detergente triton X-100 no tampão de lise. **A e B)** 00265 e 00397 (solubilidade a 37°C); **C e D)** 00062 (solubilidade a 28°C e 37°C); **E e F)** 00962 e 02009 (solubilidade a 28°C e 37°C, respectivamente); **G e H)** 01929 e 02072 (solubilidade a 28°C e 37°C, respectivamente). Os tamanhos das proteínas expressas estão descritos na figura.

Verificamos que a maioria das proteínas foi expressa de forma solúvel na temperatura de 37°C e sem a necessidade da adição do detergente. No entanto, algumas proteínas ficaram solúveis ou parcialmente solúveis apenas com o uso do detergente, enquanto outras, mesmo com o emprego deste, se mantiveram de forma insolúvel, ou seja, com possível formação de corpos de inclusão, nas condições testadas neste estudo. De acordo com Villaverde *et al.*

(2013) ¹⁶⁵, a agregação de proteínas é uma consequência comum do estresse térmico. Em bactérias recombinantes, a super-expressão de genes mediada por plasmídeos desencadeia a transcrição de genes de choque térmico e outras respostas ao estresse o que, em muitas vezes, resulta na agregação da proteína recombinante como corpos de inclusão. A formação destes depósitos representa um obstáculo importante para a produção de polipeptídeos biologicamente ativos.

De um total de 19 proteínas expressas, 5 foram de forma insolúvel, 12 de forma solúvel e 2 de forma parcialmente solúvel utilizando as temperaturas de 28°C e 37°C para a expressão das proteínas e empregando ou não detergente triton X-100 no tampão de lise.

A Tabela 5.6.1 resume os resultados de solubilidade obtidos para as proteínas recombinantes expressas nas condições empregadas neste estudo.

Tabela 5.6.1: Solubilidade das proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli* Star BL21 (DE3)

Proteína	Solubilidade	Proteína	Solubilidade
00080	Solúvel a 28°C sem triton	01909	Solúvel a 37°C sem triton
00265	Solúvel a 37°C sem triton	01967	Insolúvel
00271	Insolúvel	02232	Solúvel a 28°C sem triton
00333	Solúvel a 37°C sem triton	02277	Parcialmente solúvel a 28°C sem e com triton
00589	Solúvel a 37°C sem triton	00962	Solúvel a 37°C sem triton
00787	Insolúvel	02009	Solúvel a 37°C sem triton
02265	Solúvel a 37°C sem triton	01929	Solúvel a 37°C sem triton
01065	Solúvel a 37°C sem triton	02072	Solúvel a 37°C sem triton
01195	Insolúvel	00062	Parcialmente solúvel a 28°C sem e com triton
00397	Insolúvel		

5.7. Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes expressas fusionadas à cauda de histidina foi realizada por IMAC empregando coluna empacotada com resina contendo íons metálicos de níquel imobilizados. A proteína, quando fusionada a uma cauda de histidina, tem sua purificação facilitada, pois este aminoácido (histidina) interage com ligantes metálicos.

Neste trabalho empregamos apenas um tipo de processo de purificação, caso algum antígeno apresente potencial para ser avaliado como uma vacina experimental contra pneumococo, seu processo de purificação será aperfeiçoado. A proteína PsaA, utilizada como controle nos estudos, foi previamente clonada, expressa e purificada por nosso grupo (Larentis *et al.*, 2011 e 2012) ^{166; 167}.

A seguir exemplificamos a purificação da proteína 00333, a purificação das demais proteínas encontram-se descritas no Anexo 11.

Purificação da proteína 00333:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem a adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. A Figura 5.7.1 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 00333. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

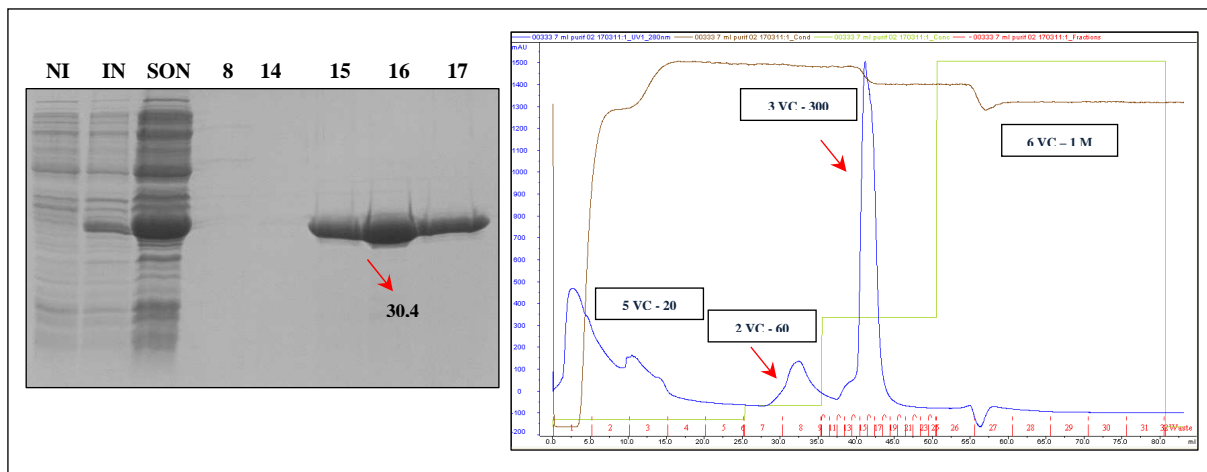


Figura 5.7.1: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 00333. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. NI, lisado da cultura de *E. coli* não induzida; IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; SON, sonicado (lisado total sonicado, da cultura de *E. coli* induzida, aplicado na coluna); fração 8 – proteína (s) eluída (s) com 60 mM de imidazol; frações 14 a 17 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM de imidazol (frações 15 a 17), sem a presença de muitos contaminantes, porém houve perda proteica no eluato (dado não mostrado). Mesmo com essa perda inicial da proteína não verificamos a eluição da mesma nas concentrações de 20 mM e 60 mM de imidazol. A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 1,2 mg/mL e pureza em torno de 75,5%.

5.8. “Immunoblotting”

5.8.1 Titulação dos anticorpos policlonais produzidos em camundongos

Para avaliarmos a antigenicidade das proteínas recombinantes pneumocócicas purificadas, bem como para titularmos os anticorpos policlonais produzidos nos camundongos utilizamos a metodologia de “immunoblotting” (“western” e “dot blot”) (Figuras 5.8.1.1 e 5.8.1.2).

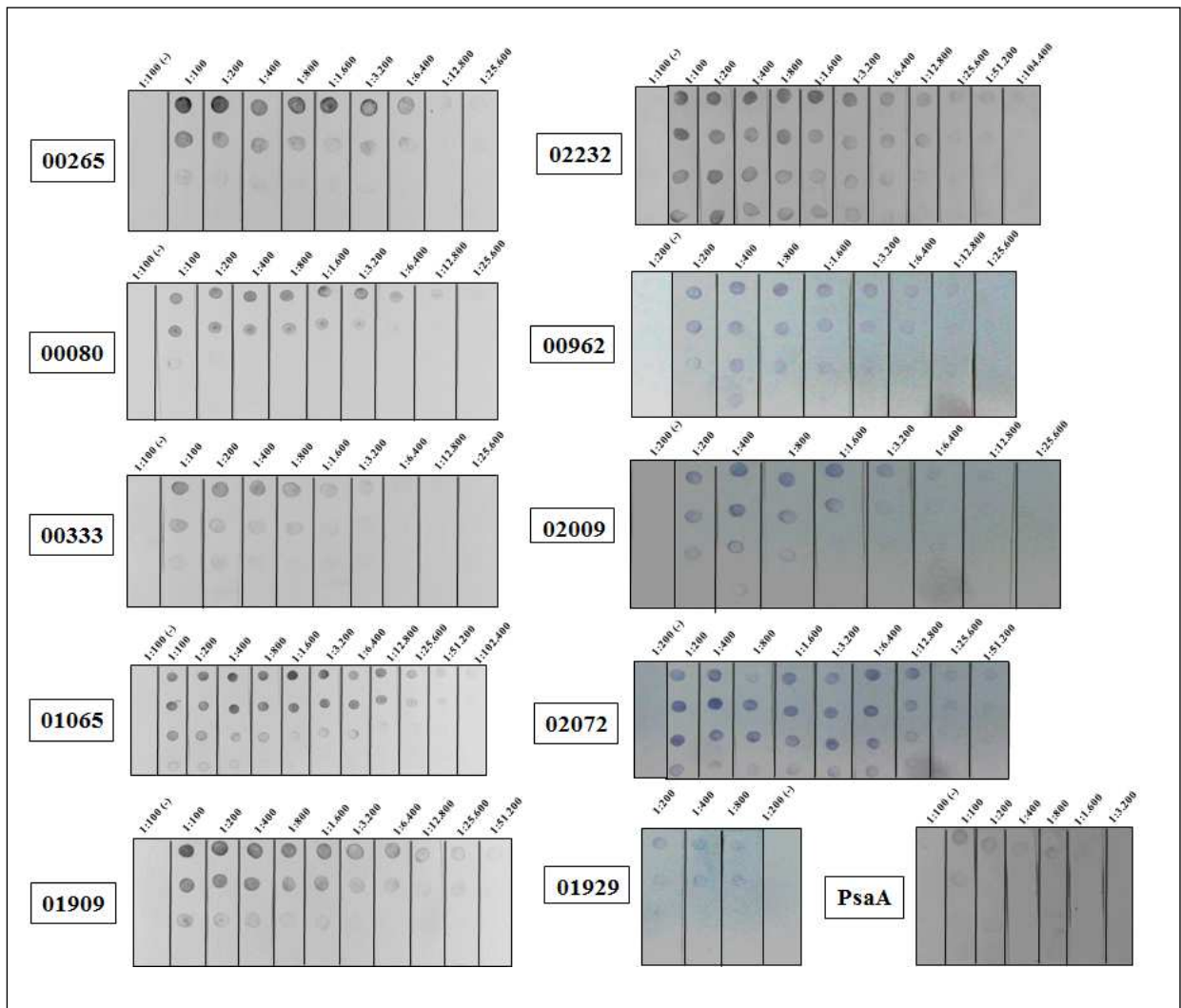


Figura 5.8.1.1: Titulação dos anticorpos policlonais, produzidos em camundongos, pela técnica de “dot blot”, utilizando sistema revelador baseado em fosfatase alcalina. Foram aplicadas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 ng de proteínas recombinantes em cada tira da membrana de nitrocelulose (de cima para baixo) e os soros animais foram utilizados nas diluições de 1:100 a 1:51.200 (da esquerda para a direita). Como controle negativo para as reações utilizamos soro proveniente de camundongo não imunizado, denominado soro pré-imune, na diluição de 1:100. O anticorpo secundário conjugado foi utilizado na diluição de 1:30.000. As proteínas testadas bem como as diluições dos anticorpos policlonais utilizados encontram-se indicados na figura.

Verificamos que todas as proteínas recombinantes de pneumococos foram antigênicas em camundongos sendo capazes de produzirem anticorpos policlonais. Contudo, observamos que as proteínas 02232, 02072, 01065 e 01909 foram mais antigênicas em relação às proteínas 01929, 00080, 00265, 00333, 02009 e 00962, sendo, portanto, capazes de gerar anticorpos policlonais com títulos mais elevados e, portanto, capazes de se ligarem as proteínas em baixas concentrações de antígeno. Os anticorpos policlonais gerados a partir das proteínas 00265, 02232, 00962, 00333, 02009, 01065, 02072 e 01909 foram capazes de reconhecer 500

ng de proteína recombinante entre as diluições de 1:3.200 e 1:51.200. As exceções foram as proteínas 00080, PsaA e 01929 reconhecidas até a diluição máxima de 1:12.800 (00080) e 1:800 (PsaA e 01929). Os anticorpos policlonais, gerados em camundongos, neste estudo, serviram para realizarmos as caracterizações das proteínas de pneumococos. Para utilizarmos como controles positivos em nossos testes, geramos anticorpo policlonal anti-PsaA assim como contra os PS para os sorotipos presentes na vacina 10-valente (Synflorix, GSK). A proteína PsaA de pneumococo é uma proteína amplamente estudada sendo descrita na literatura como exposta à superfície celular (Russell *et al.*, 1990)¹⁶⁸, capaz de induzir a produção de anticorpos que levam a inibição de aderência do pneumococo às células epiteliais de nasofaringe (Romero-Steiner *et al.*, 2003)¹⁶⁹ e capaz de proteger camundongos contra desafio (Rajam *et al.*, 2008)⁶⁶. Porém, em nosso estudo esta proteína demonstrou uma menor antigenicidade (menor título de anticorpos) quando comparada com as demais proteínas avaliadas neste estudo; sendo a concentração de 500 ng de PsaA reconhecida até a diluição de 1:800, sendo que concentrações menores de proteína não foram reconhecidas pelos anticorpos policlonais empregando a técnica de “dot blot”. No entanto, essas diferenças poderiam estar relacionadas ao desenho do nosso protocolo de imunização, incluindo: via de imunização, concentração de antígeno e concentração e tipo de adjuvante utilizados, bem como os intervalos entre as doses. Além disso, a correlação entre título e proteção não é bem definida.

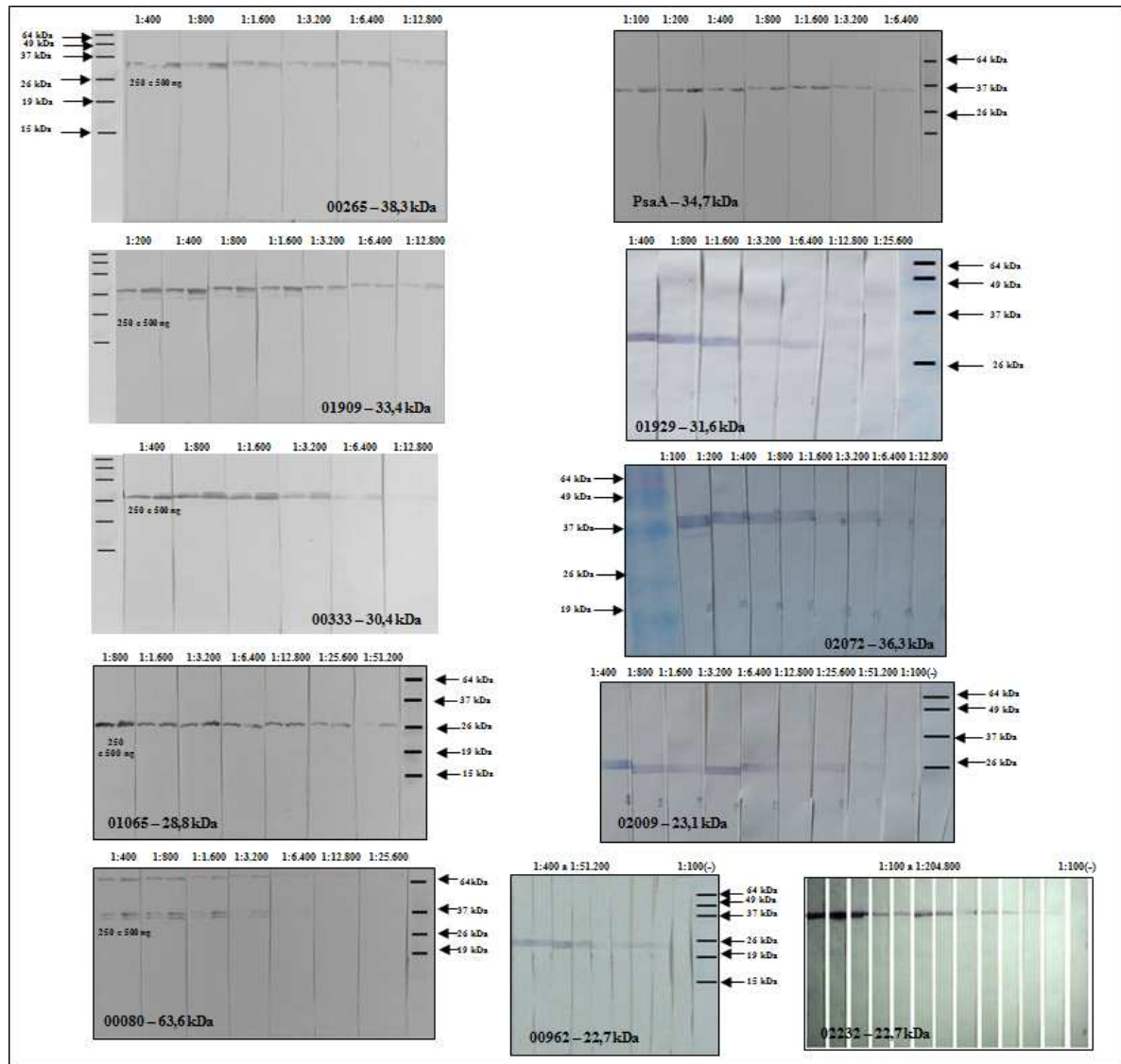


Figura 5.8.1.2: Titulação dos anticorpos policlonais, produzidos em camundongos, pela técnica de “western blot”, utilizando sistema revelador baseado em fosfatase alcalina. Foram aplicadas concentrações de 500 e/ou 250 ng de proteínas recombinantes em cada tira da membrana de nitrocelulose e os soros animais foram utilizados nas diluições de 1:100 a 1:51.200 (da esquerda para a direita), exceto para a proteína 02232 para a qual testamos até a diluição de 1:204.000. O anticorpo secundário conjugado foi utilizado na diluição de 1:30.000. As proteínas testadas bem como as diluições dos anticorpos policlonais utilizados encontram-se indicados na figura.

Para a técnica de “western blot” testamos concentrações de 500 e/ou 250 ng de proteína recombinante, assim como diluições menores dos anticorpos policlonais do que aquelas avaliadas no “dot blot”. Os anticorpos policlonais gerados a partir das proteínas 00265, 00962, 00333, 02009, 01065, 02072 e 01909 foram capazes de reconhecer 500 ng de proteína recombinante entre as diluições de 1:1.600 e 1:51.200, sendo que a proteína 02232 foi reconhecida até a titulação de 1:204.800. As proteínas 00080, PsaA e 01929, menos

antigênicas, foram reconhecidas até a diluição de 1:3.200 (00080) e 1:6.400 (PsaA e 01929).

5.8.2. Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes em relação aos soros de pacientes

Neste trabalho também foi avaliada a capacidade dos antígenos recombinantes de pneumococos serem reconhecidos pelos soros de pacientes apresentando quadro clínico de meningite pneumocócica. Para tal, foi empregado um painel sorológico composto por 24 soros os quais foram obtidos de pacientes infectados por diferentes sorotipos de pneumococo, no entanto cada paciente foi infectado por apenas um sorotipo. Foram incluídos 6 soros obtidos de crianças que não apresentavam doença pneumocócica no momento da coleta, sendo considerados como “soros negativos” em nosso estudo (Figura 5.8.2.1). Como controles positivos para o teste incluímos a proteína A, cuja porção Fc da imunoglobulina G se liga a proteína, e a proteína PsaA a qual sabemos ser conservada e amplamente distribuída entre *S. pneumoniae* e capaz de ser reconhecida por soros de indivíduos infectados (Morrison *et al.*, 2000; Holmlund *et al.*, 2006)^{65; 170}.

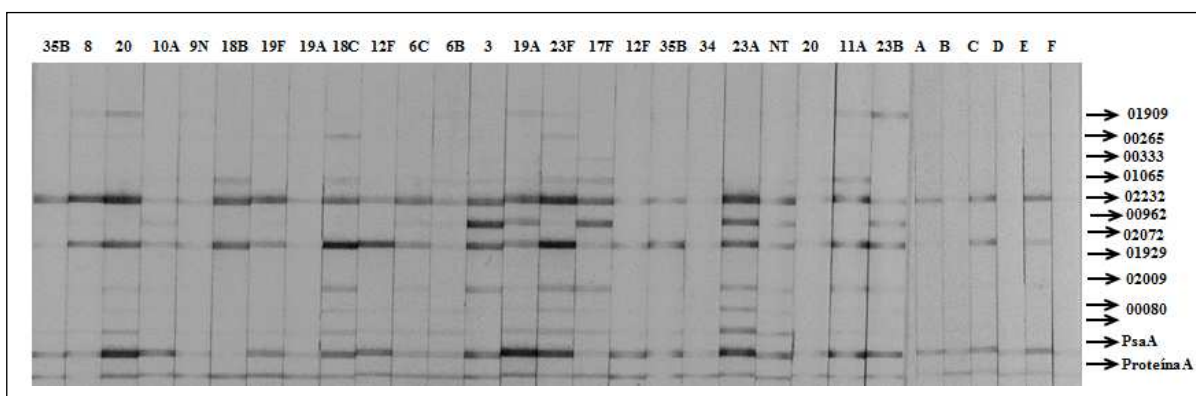


Figura 5.8.2.1: Antigenicidade das proteínas recombinantes de pneumococos empregando soros de pacientes diagnosticados com meningite pneumocócica – avaliação por MAPIA. A identificação das proteínas recombinantes está representada no lado direito da figura, na parte superior estão indicados os sorotipos de pneumococos isolados dos pacientes cujas amostras de soros foram coletadas. NT – não tipável; A a F – “soros negativos”. As proteínas recombinantes foram utilizadas na concentração de 200 ng, o anticorpo primário (soro dos pacientes) foi utilizado na diluição de 1:200 e o anticorpo secundário conjugado na diluição de 1:30.000. A revelação foi realizada empregando sistema revelador baseado em fosfatase alcalina.

Diversos trabalhos têm relatado a presença de anticorpos anti-proteínas pneumocócicas no soro de crianças e adultos, como por exemplo os estudos de Bogaert *et al.* (2006) (PpmA)¹⁷¹, Holmlund *et al.* (2006) (PspA, PsaA e Ply)¹⁷⁰, Simell *et al.* (2006) (NanA)¹⁷², Holmlund *et al.* (2007) (PthE e PhtB)¹⁷³, Holmlund *et al.* (2009) (PhtD, CbpA e LytC)¹⁷⁴, entre outros.

Em nosso estudo, assim como nos trabalhos acima mencionados, verificamos que três soros (A, C e E) - controles negativos - apresentaram anticorpos anti-02072 (PiuA), anti-02232 (CbpE) e anti-PsaA, enquanto que os outros três soros avaliados (B, D e F) apresentaram anticorpos anti-PsaA apenas. Comparando os soros negativos com aqueles obtidos de pacientes com meningite pneumocócica, observamos que a grande maioria foi capaz de reagir com as proteínas PsaA (23 de 24 soros), 02072 (17 de 24) e 02232 (23 de 24). Entretanto, podemos observar que as bandas correspondentes a essas proteínas apresentaram reatividade mais forte com os soros dos pacientes infectados quando comparados àquelas obtidas com os soros negativos (A a F), demonstrando que pessoas com meningite pneumocócica geram resposta imune, mediada por anticorpo, contra essas proteínas.

As proteínas 01909, 00080, 02009, 00962, 01065, 00333 e 00265, diferentemente das proteínas descritas anteriormente, foram reconhecidas por um menor número de soros; 11 dos 24 soros para 00080, 10 de 24 para 02009, 9 de 24 para 01065, 7 dos 24 soros para 01909, 7 de 24 para 00962, 2 de 24 para 00265, 1 de 24 para 00333.

Além disso, observamos visualmente que as bandas dessas proteínas apresentaram uma menor intensidade de reação quando comparadas com as bandas reconhecidas para as proteínas PsaA, 02072 e 02232, demonstrando assim uma menor reatividade dos soros dos pacientes contra aquelas proteínas. Embora a proteína 00962 tenha sido reconhecida por apenas 7 dos 24 soros analisados, 4 desses soros foram capazes de reagir fortemente com essa proteína. A proteína 01929 não foi reconhecida por nenhum dos soros de pacientes avaliados, permitindo supor que essa proteína pode ser expressa em baixos níveis durante a infecção ou é pouco antigênica na manifestação clínica de meningite. Essas mesmas hipóteses podem ser aplicadas às proteínas 00333 e 00265 que foram reconhecidas por um pequeno número de soros de pacientes. É importante lembrar que as proteínas 00333 e 00265 empregadas no teste não foram expressas em sua totalidade, ou seja, para a amplificação e clonagem do gene *00333* foram retirados 65% do fragmento gênico original e para o gene *00265* foi retirado 27%. A proteína 00333 expressa compreendeu apenas os aminoácidos de 307 a 536, sendo o tamanho original da proteína de 663 aminoácidos, ao passo que para a proteína 00265 os 115 aminoácidos iniciais não foram expressos. A retirada destas porções proteicas pode interferir na conformação da proteína e conseqüentemente nos epítomos expostos, podendo estes ser diferente daqueles epítomos expressos pelas proteínas originais, levando, portanto a uma menor antigencidade das proteínas recombinantes. Para as demais proteínas testadas e que demonstraram ser reconhecidas por mais de 60% dos soros, como as proteínas 02072 e 02232, para a clonagem e expressão foi retirada apenas a porção gênica codificando para o peptídeo sinal. O mesmo foi realizado para as demais proteínas avaliadas

(00080, 02009, 01909, 00962). Estas proteínas também foram reconhecidas por um maior número de soro de pacientes do que as proteínas 00333 e 00265, talvez por não haver tanta interferência na conformação proteica em função da retirada apenas do peptídeo sinal da proteína.

A presença de anticorpos contra as proteínas recombinantes de pneumococos avaliadas neste estudo indica haver produção de uma resposta imune contra estes antígenos, embora tal resposta não possa ser relacionada ao potencial protetor dessas proteínas. Os dados indicam que essas proteínas são expressas “in vivo” e são capazes de induzir resposta imune durante a infecção. Além disso, podemos destacar a reatividade cruzada dessas proteínas, já que os pacientes foram infectados com diferentes sorotipos de pneumococos, portanto os soros gerados são contra as proteínas expressas pelos diferentes sorotipos e demonstraram reação contra as proteínas recombinantes do sorotipo 5. No trabalho de Wizemann *et al.* (2001)¹¹³ também é demonstrada a reatividade cruzada para 5 proteínas de pneumococos, diferentes das analisadas em nosso estudo, utilizando soros de pacientes convalescentes que apresentaram pneumonia pneumocócica.

Analisando o conjunto dos dados de antigenicidade das proteínas 02072 e 02232, podemos observar que essas foram capazes de gerar altos títulos de anticorpos nos animais. Além disso, demonstraram também ser altamente antigênicas em pacientes com meningite pneumocócica. Contudo, não observamos resultado semelhante para a proteína 01065, que demonstrou ser altamente antigênica nos animais, mas não em pacientes, pois apenas 9 dos 24 soros (37,5%) foram capazes de reconhecer esta proteína.

As proteínas 00333 e 01929 demonstram baixa antigenicidade em animais e foram fracamente reconhecidas pelos soros humanos. Entretanto, a proteína 00080 demonstrou baixa antigenicidade em modelo murino, mas demonstrou ser reconhecida por 11 dos 24 soros (45,8%) de pacientes avaliados. Do mesmo modo, a PsaA demonstrou ser pouco antigênica em modelo animal, em nosso estudo, mas demonstrou ser reconhecida pela quase totalidade dos soros testados. Portanto, não podemos estabelecer uma correlação entre o potencial antigênico das proteínas recombinantes frente a anticorpos policlonais gerados em modelos animais com o potencial antigênico destas proteínas frente a soros de pacientes apresentando meningite pneumocócica. Além disso sabemos que o processo de regulação da expressão gênica é complexo e que pneumococo pode regular positiva ou negativamente a expressão de suas proteínas em condições “in vitro” e “in vivo”, de acordo com a forma clínica da doença que está causando ou até mesmo em estar formando ou não biofilme (Ogunniyi *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2011, Mahdi *et al.*, 2012)^{175; 176; 177}.

5.9. Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos

A escolha da técnica de citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas selecionadas de pneumococos na superfície bacteriana foi baseada em estudos publicados por Wizemann *et al.*, 2001; Gor *et al.*, 2005 e Shah *et al.*, 2006^{113; 134; 135}.

Após a definição das melhores condições da técnica realizamos as marcações bacterianas com os anticorpos policlonais gerados em camundongos.

Para este estudo não utilizamos nenhum agente desnaturante ou permeabilizante nos tampões, portanto a marcação detectada refere-se àquela demonstrada por proteínas expressas e expostas na superfície da célula bacteriana. Um total de três a seis experimentos de marcação independentes (realizados em dias diferentes), para cada uma das proteínas em estudo (02072, 00962, 02232, 01909, 01929, 02009, 00080, 00333, 00265, 01065) e para cada um dos dez sorotipos bacterianos testados (sorotipos presentes na vacina conjugada 10-valente (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), foram realizados.

Como controles negativos utilizamos as células de pneumococos não marcadas, de forma a eliminar algum evento de autofluorescência, células marcadas apenas com o anticorpo secundário conjugado, na ausência de anticorpo primário, para eliminarmos marcações inespecíficas e células marcadas com soro pré-imune, ou seja, soro de animal não imunizado, para também eliminarmos marcações inespecíficas. Como controles positivos para as marcações utilizamos os anticorpos policlonais anti-PsaA e anti-10-valente gerados em camundongos, pois é descrito que a proteína PsaA é expressa na superfície bacteriana (Russell *et al.*, 1990)¹⁶⁸ ao passo que o soro anti-10-valente é capaz de reconhecer os PS bacterianos dos dez sorotipos de pneumococos contidos na vacina 10-valente (dados não mostrados para as marcações do PS). Além destes controles realizamos a marcação de dois sorotipos de pneumococos, 4 e 9V, com os anticorpos policlonais anti-PsaA e anti-02072, adsorvidos e não adsorvidos com lisado de *E. coli*, a fim de demonstrarmos que a marcação visualizada foi específica para as proteínas em estudo. Também incluímos em nossa análise a marcação do *S. agalactiae* para demonstrarmos a não reatividade cruzada dos anticorpos policlonais gerados.

Nas Figuras 5.9.1 e 5.9.2 são demonstrados os perfis de marcações obtidos para as dez proteínas avaliadas, nos dez sorotipos de pneumococos (gráficos com “overlay”), assim como os perfis de marcações para os sorotipos 4 e 9V utilizando os anticorpos policlonais anti-PsaA e anti-02072 adsorvidos ou não com lisado de *E. coli*. Na Figura 5.9.3 são demonstrados os percentuais de células FITC+ expressando cada uma das proteínas na superfície dos dez sorotipos de pneumococos.

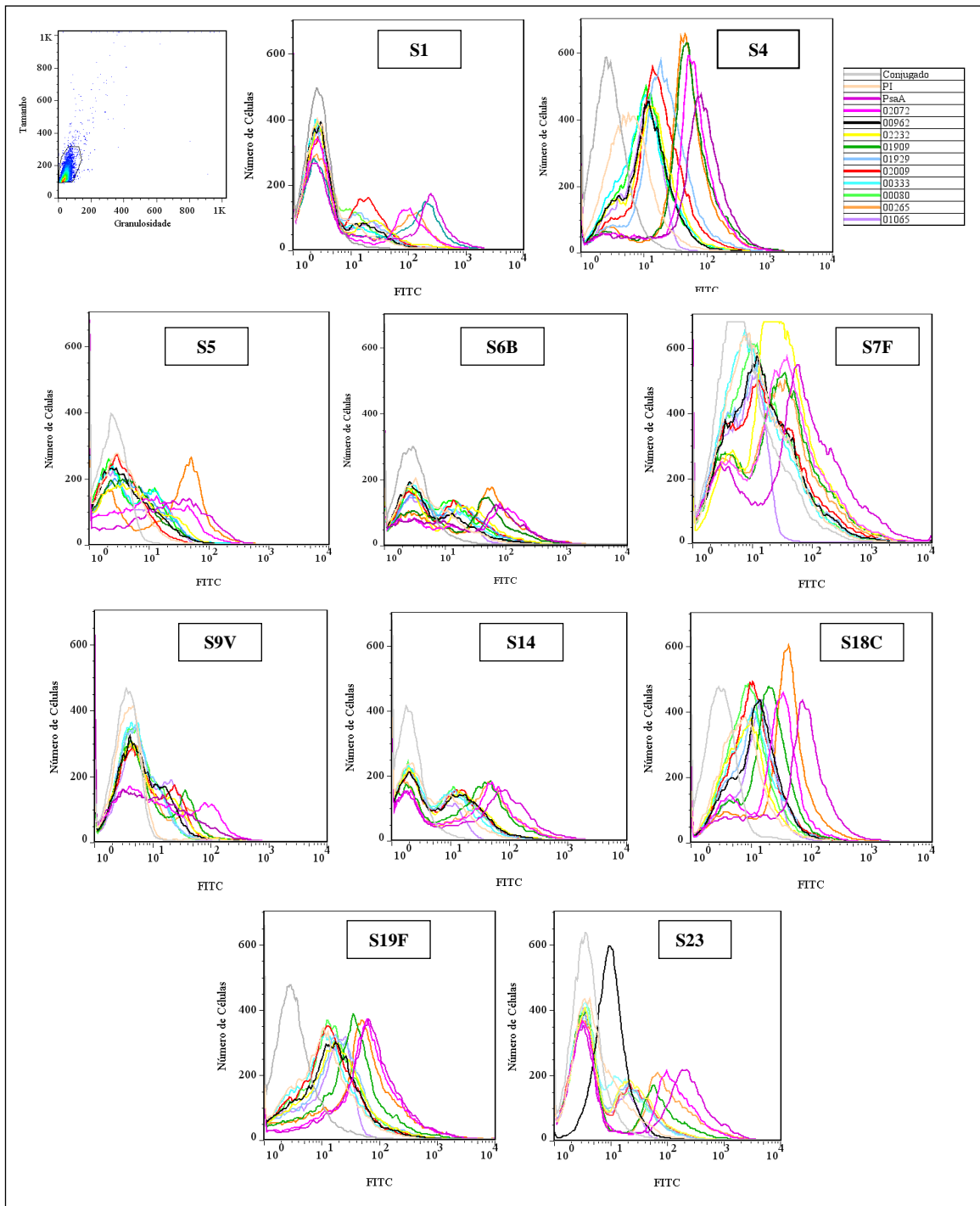


Figura 5.9.1: Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas 02072, 00265, 01929, 01065, 02232, 00080, 00333, 00962, 01909 e 02009 na superfície de pneumococos. O anticorpo policlonal anti-PsaA foi utilizado como controle positivo para a marcação desta proteína na superfície bacteriana. Como controle negativo utilizamos a marcação apenas com o anticorpo secundário conjugado com FITC e com o soro proveniente de camundongo não imunizado, denominado soro pré-imune (PI). Os anticorpos policlonais primários foram utilizados na diluição de 1:100 e o anticorpo secundário conjugado com FITC na diluição de 1:250. O primeiro gráfico refere-se ao de “dot plot” demonstrado o perfil de granulosidade x tamanho das células bacterianas avaliadas, assim como a região (“gate”) selecionada para avaliação. Os gráficos com sobreposição demonstram a expressão, na superfície bacteriana, das dez proteínas pneumocócicas avaliadas neste estudo nos dez sorotipos de pneumococos contemplados na vacina 10-valente.

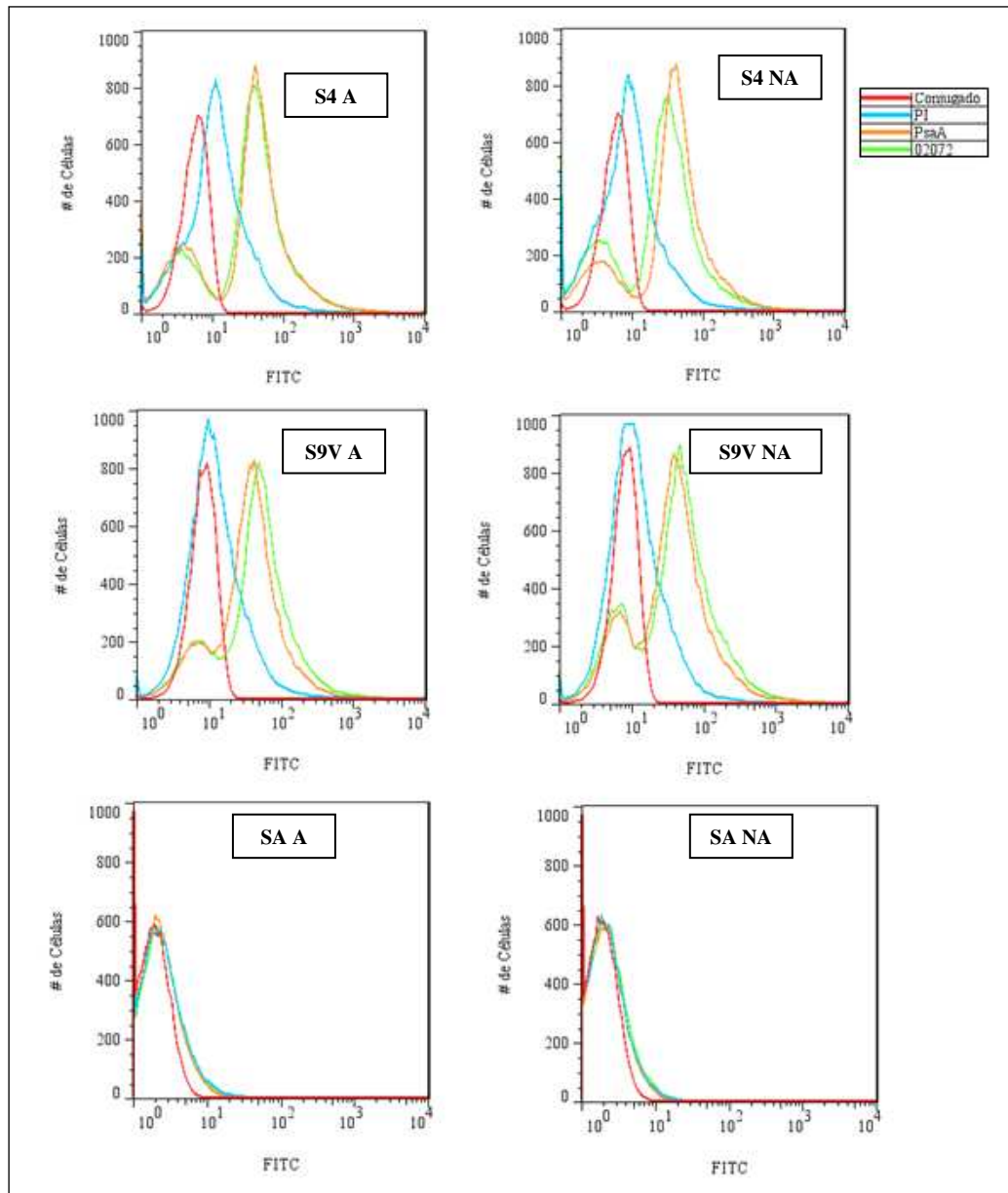


Figura 5.9.2: Citometria de fluxo para avaliação da expressão das proteínas PsaA e O2072 na superfície de pneumococos e *S. agalactiae* ATCC 13813. Como controle negativo utilizamos a marcação apenas com o anticorpo secundário conjugado com FITC e com o soro proveniente de camundongo não imunizado, denominado soro pré-imune (PI). Os anticorpos policlonais primários foram utilizados na diluição de 1:100 e o anticorpo secundário conjugado com FITC na diluição de 1:250. Os gráficos com sobreposição demonstram a expressão, na superfície bacteriana, das proteínas PsaA e O2072, nos sorotipos 4 e 9V de pneumococos, assim como em *S. agalactiae* ATCC 13813 utilizando os anticorpos policlonais adsorvidos (S4 A, S9V A e SA A) e não adsorvidos (S4 NA, S9V NA e SA NA) com lisado de *E. coli*. S4 – *S. pneumoniae* sorotipo 4, S9 – *S. pneumoniae* sorotipo 9, SA – *S. agalactiae*, A – adsorvido, NA – não adsorvido.

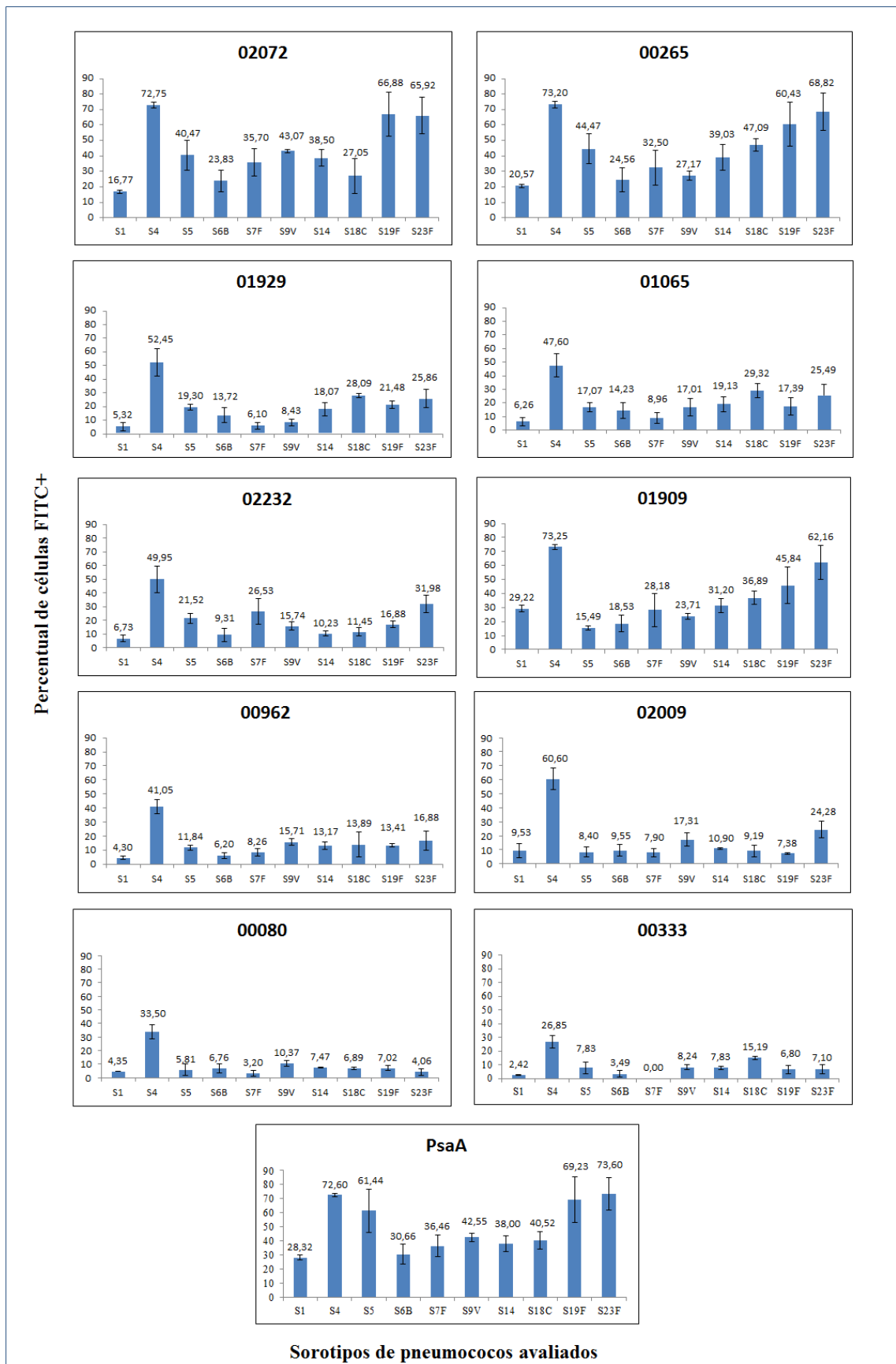


Figura 5.9.3: Percentual de células pneumocócicas expressando as proteínas 02072, 00265, 01929, 01065, 02232, 00080, 00333, 00962, 01909 e 02009 na superfície de pneumococos. Os dados percentuais de marcação FITC+ das células bacterianas foram

obtidas a partir das análises de citometria de fluxo. O anticorpo policlonal anti-PsaA foi utilizado como controle positivo para a marcação desta proteína na superfície bacteriana. Como controle negativo utilizamos a marcação apenas com o anticorpo secundário conjugado e com o soro proveniente de camundongo não imunizado, denominado soro pré-imune (PI). Os valores demonstrados nos gráficos são aqueles resultantes da subtração do percentual de células FITC+ para cada proteína avaliada do percentual de células marcadas inespecificamente utilizando o soro PI. Os experimentos foram realizados de três a seis vezes e a barra de erro é indicada.

Para o controle negativo foram utilizadas as células de pneumococos não marcadas e verificamos que a fluorescência (FITC+) ficou entre 0,1-0,2%, demonstrando que as bactérias não apresentaram autofluorescência. Para as células marcadas com o anticorpo secundário conjugado verificamos que a marcação de FITC+ ficou entre 0,1-1%, demonstrando a baixa inespecificidade entre este anticorpo e a célula bacteriana, sendo este índice aceitável para essa técnica. Além disso, selecionamos dois sorotipos (4 e 9V) e dois anticorpos policlonais (contra as proteínas PsaA e 02072) e realizamos a adsorção destes anticorpos com 2,5% v/v de lisado de *E. coli* para verificarmos se a marcação observada poderia ser alguma reação inespecífica, uma vez que os soros utilizados na técnica foram policlonais. Verificamos que, para ambos os soros testados com ambos os sorotipos, as marcações com os anticorpos policlonais adsorvidos e não adsorvidos foi semelhante, com uma variação de cerca de $\pm 3-5\%$, demonstrando que as marcações visualizadas foram específicas para as amostras em estudo. Para o sorotipo 4 observamos uma marcação de 90,3% para a proteína PsaA utilizando o anticorpo policlonal não adsorvido e 93,3%, com o anticorpo adsorvido; para o sorotipo 9V a marcação foi de 75,7%, com o anticorpo não adsorvido, e 77,4%, com o anticorpo adsorvido. Para a proteína 02072 observamos marcação de 86,6%, no sorotipo 4, utilizando o anticorpo policlonal não adsorvido, e 83,7%, com o anticorpo adsorvido; para o sorotipo 9V a marcação foi de 87,4%, com o anticorpo não adsorvido, e 81,4%, com o anticorpo adsorvido. Também foi realizada a marcação de *S. agalactiae* ATCC 13813 com ambos os anticorpos policlonais descritos acima, igualmente adsorvidos ou não, a fim de termos mais um controle confirmando a especificidade da reação. Não foi verificada marcação em nenhuma das condições testadas, confirmando a especificidade da marcação das proteínas na superfície dos pneumococos.

Foi observado que as proteínas avaliadas neste estudo são expressas na superfície de pneumococos (Figura 5.9.1) uma vez que observamos um deslocamento dos picos, referentes às marcações das proteínas, em relação aos picos correspondentes às células marcadas apenas com o anticorpo secundário conjugado (linha cinza nos gráficos) ou marcadas com o soro pré-imune (linha rosa claro nos gráficos).

Além da exposição na superfície dos pneumococos, a técnica de citometria de fluxo é uma técnica quantitativa capaz de fornecer o percentual de células marcadas para a região avaliada (“gate”). Diante disto, o estudo nos permitiu avaliar o nível de expressão das dez proteínas analisadas nos diferentes sorotipos de pneumococos.

O anticorpo policlonal gerado em camundongos contra a vacina 10-valente foi capaz de reconhecer os PS na superfície dos dez sorotipos de pneumococos avaliados neste estudo (dados não mostrados nas figuras). A média percentual de células marcadas para cada sorotipo foi variável sendo que para o sorotipo 1 a marcação média foi de cerca de 36%, para o 4 de 71%, o 5 de 18%, o 6B de 9%, o 7F de 4%, o 9V de 21%, o 14 de 33%, o 18C de 39%, o 19F de 25% e o 23F de 8%. No controle positivo utilizando o anticorpo policlonal anti-PsaA verificamos que houve marcação na superfície para todos os sorotipos, sendo que a média desta marcação variou de 28% (sorotipo 1) a 74% (sorotipo 23F). Os sorotipos 1 e 6B foram os que apresentaram percentuais mais baixos de células marcadas expressando a proteína PsaA, entre 28%-30%. Os sorotipos 7F, 9V, 14 e 18C apresentaram marcação entre 36%-42% de células FITC+ e os sorotipos 4, 5, 19F e 23F entre 61%-74% (ver Figura 5.9.3).

Sanchez *et al.* (2011)¹⁷⁸ demonstraram que as proteínas PspA, CbpA e PsrP apresentaram diferentes níveis de acessibilidade aos anticorpos, sendo esta acessibilidade dependente da presença ou ausência de cápsula na superfície bacteriana. Além disso, a acessibilidade maior e menor do anticorpo está relacionada ao tipo capsular expresso, ou seja, dependendo do sorotipo bacteriano analisado. Ainda nesse trabalho Sanchez *et al.* (2011) (170) demonstraram que os sorotipos 6A, 7F e 23F apresentaram reduzida acessibilidade aos anticorpos em comparação ao sorotipo 4 que demonstrou maior acessibilidade. Além disso, demonstraram que a presença de cápsula bloqueou a acessibilidade aos anticorpos ao comparar cepa não capsulada e cepas capsuladas. Em nosso estudo também observamos percentuais variáveis de células pneumocócicas marcadas para as dez proteínas avaliadas, entre os diversos sorotipos analisados. Além da abordagem realizada por Sanchez *et al.* (2011)¹⁷⁸ em relação a acessibilidade das proteínas nos diferentes sorotipos, exploramos a hipótese de ocorrência de uma expressão diferencial das proteínas nos sorotipos de pneumococos, como demonstrado no trabalho de Ogunnji *et al.* (2002) (167).

No entanto, entendemos que essa comparação na variação do percentual de marcação das células apenas pode ser realizada quando analisamos os dados obtidos para a marcação de uma mesma proteína entre os diferentes sorotipos. Essa hipótese se baseia no fato de que os anticorpos policlonais gerados apresentaram diferentes titulações, assim entendemos que para um mesma diluição de anticorpo, alguns soros podem apresentar uma maior quantidade de moléculas de anticorpos específicos para determinada proteína do que outro soro. Neste

contexto, podemos supor que determinada proteína é mais ou menos expressa na superfície de um determinado sorotipo de pneumococo, ou que determinada proteína apresenta maior ou menor acessibilidade aos anticorpos. Porém com os nossos estudos não temos como afirmar se a maior ou menor marcação de determinadas proteínas é referente a expressão variável destas proteínas em pneumococos ou é referente a acessibilidade diferencial a estas proteínas por parte dos anticorpos.

Para a proteína 02072 verificamos que houve uma maior percentual de marcação para os sorotipos 4, 19F e 23F (entre 60-73%) quando comparados com os demais sorotipos (entre 15 e 45%); percentuais semelhantes de marcação foram observados para a proteína 00265.

As proteínas 01929 e 01065 apresentaram percentuais semelhantes de marcação, na superfície dos sorotipos 4 (52% e 47%, respectivamente), 18C (28% e 29,3%, respectivamente), 23F (25,8% e 25,4%, respectivamente) e 19F (22,4% e 17,3%, respectivamente). A proteína 02232, por sua vez, apresentou maior marcação na superfície dos sorotipos 4, 7F e 23F. Para as proteínas 00080, 00333 e 00962 observamos que houve uma maior marcação nos sorotipos 4 e 9V e em percentuais próximos, entre 20-30% e 10-15%, respectivamente. O sorotipo 4 apresentou uma marcação percentual em torno de 60% para a proteína 02009, enquanto que para os demais sorotipos os níveis de marcação para esta proteína foram abaixo de 25%, podendo indicar um maior nível de expressão desta proteína no sorotipo 4 ou maior acessibilidade desta proteína, aos anticorpos, neste sorotipo.

Se considerarmos os percentuais de marcações diferenciais das proteínas nas superfícies dos pneumococos, levando em consideração a abordagem da acessibilidade diferencial dos anticorpos a estas proteínas, verificamos que os resultados do nosso estudo corroboram com aqueles observados por Sanchez *et al.* (2011)¹⁷⁸ que encontraram maior marcação das proteínas no sorotipo 4. No mesmo estudo foi observado que o sorotipo 23F apresentou menor marcação para as proteínas avaliadas (CbpA, PspA e PsrP), em comparação com os sorotipos 6A e 7F. Contudo, em nosso estudo observamos que o sorotipo 23F foi o segundo sorotipo a apresentar maior marcação de células positivas, para as diferentes proteínas analisadas, seguido pelos sorotipos 19F, 18C, 14 e 9V, respectivamente. No entanto exceções foram observadas, por exemplo: as proteínas 01929, 01065 e 00333 apresentaram maior marcação no sorotipo 18C; a 02232 no sorotipo 7F e a 02009 nos sorotipos 23F e 9V.

Em nosso estudo não avaliamos o sorotipo 6A, mas avaliamos o 6B, sendo que este sorotipo, juntamente com os sorotipos 1 e 7F, foi um dos que apresentou menor percentual de células marcadas para todas as proteínas avaliadas. Exceção foi observada para as proteínas 02232 e 01909, que marcaram cerca de 26% e 28%, respectivamente, no sorotipo 7F. As demais proteínas avaliadas apresentaram um percentual de marcação menor do que 10% no

sorotipo 7F, sendo que a proteína 00333 não apresentou marcação neste sorotipo. Para o sorotipo 1, de um modo geral, verificamos que o percentual de marcação foi menor do que 10% para as proteínas avaliadas, exceto para as proteínas PsaA, 02072, 00265 e 01909 que apresentaram percentuais de marcação em torno de 28%, 17%, 21% e 29%, respectivamente.

Assim, de um modo geral observamos que as proteínas 00080, 00333, 00962 e 02009 apresentaram menor percentual de marcação nos dez sorotipos avaliados em comparação com as proteínas PsaA, 02072, 00265, 01929, 01065, 02232 e 01909.

Na literatura há relatos de outros trabalhos utilizando a técnica de citometria de fluxo para o estudo de proteínas de superfície em pneumococos, como por exemplo a avaliação das proteínas PfbA (Yamaguchi *et al.*, 2008)⁸⁸, PotD (Sha *et al.*, 2006)¹³⁵, PpmA e PspA (Gor *et al.*, 2005)¹³⁴, CbpE (02232) (Atalli *et al.*, 2005)¹⁶⁰ e PiuA (02072) (Jomaa *et al.*, 2005)¹⁵¹, sendo estas duas últimas proteínas igualmente avaliadas em nosso estudo. No entanto não temos conhecimento, até o momento, de descrição na literatura, do estudo das demais proteínas incluídas neste trabalho.

Em relação a proteína PsaA há controvérsias, na literatura, em relação a sua localização celular. Russell *et al.* (1990)¹⁶⁸ demonstraram que anticorpos monoclonais são capazes de se ligarem à superfície do pneumococo cepa R36A, ao passo que Gor *et al.* (2005)¹³⁴ não conseguiram identificar esta proteína na superfície da cepa A66.2 (sorotipo 3). Esses dois estudos utilizaram diferentes metodologias: enquanto Russell *et al.* (1990)¹⁶⁸ utilizaram anticorpo monoclonal anti-PsaA e imunofluorescência, Gor *et al.* (2005)¹³⁴ utilizaram a técnica de citometria de fluxo e marcação com anticorpos policlonais. No trabalho de Rajam *et al.* (2008)⁶⁶, assim como no de Sanchez *et al.* (2011)¹⁷⁸, foi abordada a questão de que a acessibilidade da PsaA está ligada a quantidade de cápsula expressa na superfície dos pneumococos. Ogunniji *et al.* (2002)¹⁷⁵ descreveram que não somente a expressão dos PS é diferencialmente regulada “in vitro” e “in vivo”, mas também diversos fatores de virulência. Os dados do nosso estudo concordam com aqueles descritos por Gor *et al.* (2005)¹³⁴, ou seja, verificamos que a proteína PsaA foi expressa na superfície de diferentes sorotipos de pneumococos quando estes foram crescidos em meio de cultura sólido contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Os resultados de nosso estudo permitiram validar os dados preditivos “in silico” que indicavam a exposição, na superfície, das proteínas selecionadas. Além disso, as ferramentas de bioinformática utilizadas em nosso trabalho demonstraram a sua aplicação e potencial para identificar e selecionar candidatos para projetos de desenvolvimento de vacina e diagnóstico. Adicionalmente demonstramos a funcionalidade dos anticorpos policlonais produzidos, a partir da imunização com as proteínas recombinantes do sorotipo 5, que foram capazes de

reconhecer epítomos nas proteínas nativas (proteínas expressas “in vitro” pelos pneumococos), além de apresentarem reatividade cruzada entre os diversos sorotipos avaliados.

5.10. Imunofluorescência indireta para avaliação da expressão das proteínas na superfície dos pneumococos

A técnica de imunofluorescência indireta, assim como a técnica de citometria de fluxo, foi empregada com objetivo de confirmar a expressão das proteínas na superfície dos pneumococos. Como descrito anteriormente, estudos de Russell *et al.* (1990) e Yamaguchi *et al.* (2008)^{88; 168} demonstraram a expressão das proteínas PfbA e PsaA na superfície de pneumococos empregando a técnica de imunofluorescência, sendo que Russell *et al.* (1990)¹⁶⁸ utilizaram anticorpos monoclonais anti-PsaA, ao passo que Yamaguchi *et al.* (2008)⁸⁸ utilizaram anticorpos policlonais gerados em coelhos anti-PfbA.

Para a realização desta técnica utilizamos a bactéria *S. pneumoniae* 5 617/00 e os anticorpos policlonais, gerados em camundongos, contra as dez proteínas recombinantes avaliadas em nosso estudo (Figura 5.10.1).

A bactéria pneumococo apresenta tamanho de 0,5 a 1,25 µm de diâmetro e nas fotografias de IFI é visualizada como pequenos pontos verdes, uma vez que o anticorpo secundário utilizado é conjugado ao fluorocromo FITC. Em algumas lâminas foi possível visualizarmos um halo menos corado em torno de algumas células bacterianas, demonstrando ser uma região com densidade diferente, sugerindo ser a presença do PS; a presença de diplococos, arranjo apresentado por essa bactéria, pode ser observada em algumas regiões das lâminas.

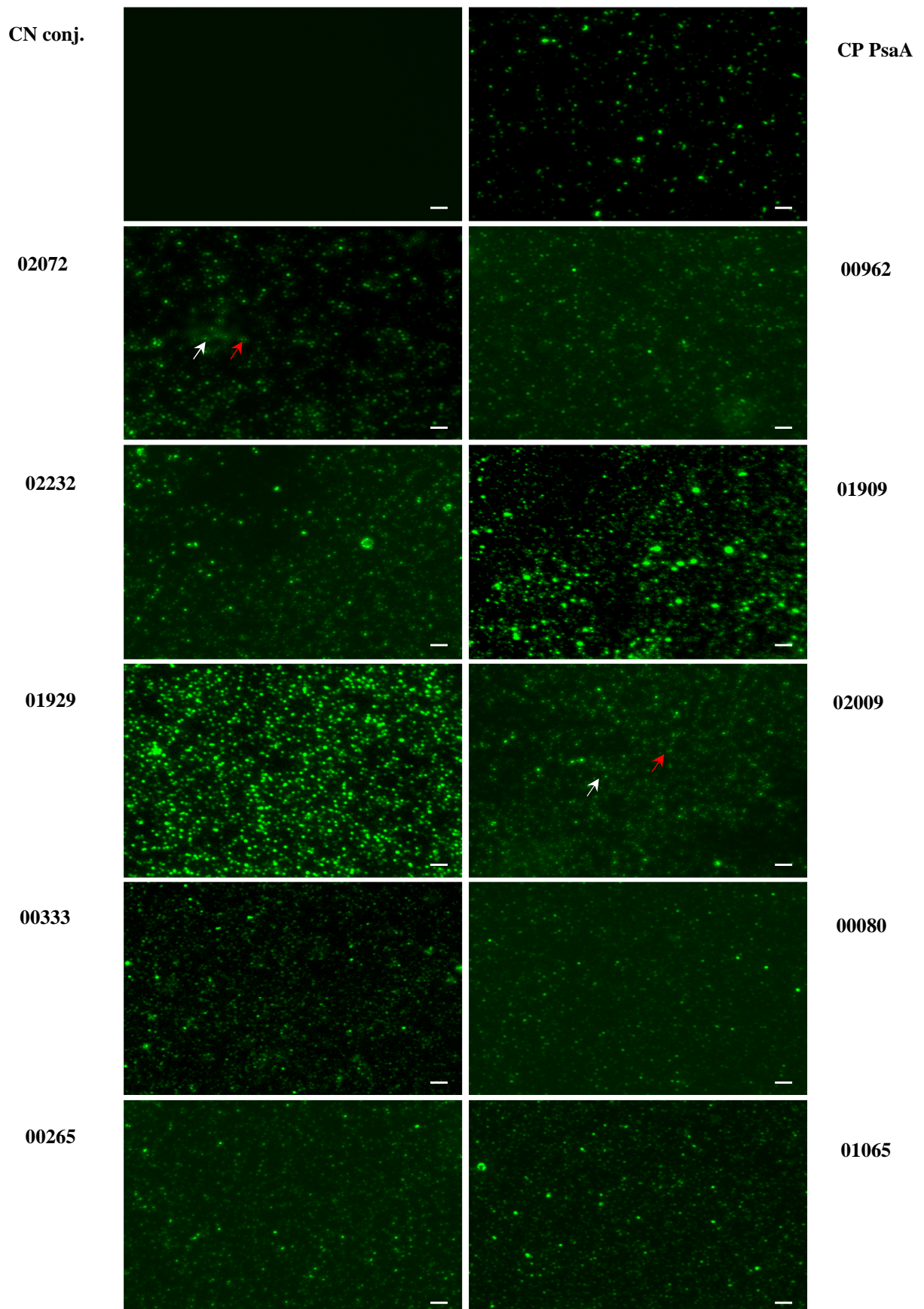


Figura 5.10.1: Imunofluorescência indireta para estudo da expressão de proteínas de superfície em pneumococos. A barra branca no canto inferior direito de cada painel indica o tamanho de 2 μm . Ao lado de cada figura é indicada a proteína visualizada, após realizada a

marcação com os anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes. Em algumas fotos foi possível observarmos um halo menos corado em torno de algumas células bacterianas, sugerindo a presença do antígeno capsular (seta branca), assim como foi possível visualizarmos a formação de alguns diplococos (seta vermelha). O anticorpo policlonal anti-PsaA foi utilizado como controle positivo para a marcação desta proteína na superfície bacteriana (CP PsaA). Como controle negativo utilizamos a marcação apenas com o anticorpo secundário conjugado com FITC (CN conj.). Os anticorpos policlonais primários foram utilizados na diluição de 1:100 e o anticorpo secundário conjugado com FITC na diluição de 1:250.

Os resultados observados na IFI complementam aqueles demonstrados pela técnica de citometria de fluxo, ou seja, verificamos que as dez proteínas de pneumococos avaliadas neste estudo são expressas na superfície bacteriana do *S. pneumoniae* 5 617/00. Além disso, os resultados obtidos pelas duas técnicas validaram os resultados preditivos obtidos pelas análises “in silico” de localização dessas proteínas na superfície de pneumococos.

5.11. Ensaio de adesão e inibição da adesão celular

A participação das proteínas recombinantes de pneumococos no processo de aderência às células eucarióticas A549, células de adenocarcinoma alveolar humano, foi avaliada por citometria de fluxo. Para o teste utilizamos as células eucarióticas acima descritas e a bactéria *S. pneumoniae* 5 617/00.

Para verificarmos a capacidade de adesão de *S. pneumoniae* 5 617/00 às célula A549 e estabelecermos o MOI de infecção destas células realizamos alguns ensaios preliminares. Avaliamos o MOI de infecção 1:100 e 1:500 utilizando a concentração de 10^8 UFC de bactéria (Figura 5.11.1).

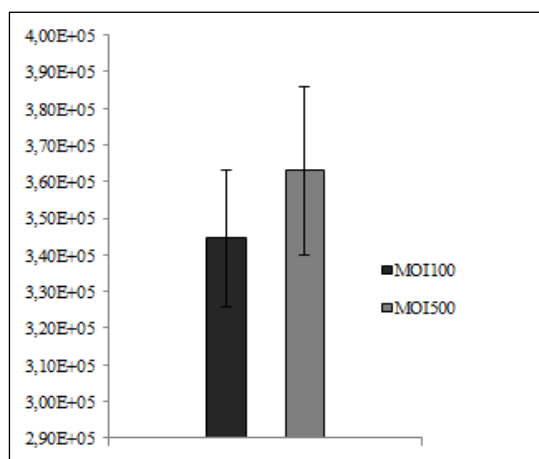


Figura 5.11.1: Avaliação do MOI para infecção das células A549 com *S. pneumoniae* 5 617/00. Os experimentos foram realizados três vezes e a barra de desvio padrão é indicada na figura.

Verificamos que *S. pneumoniae* 5 617/00 foi capaz de aderir às células A549, embora o percentual de adesão tenha sido baixo e em torno de ~0,3-0,4%, ou seja, de cada 10^8 UFC de bactérias colocadas em contato com as células A549, em torno de $3,5 \times 10^5$ UFC foram capazes de aderir. Os resultados não demonstraram diferenças em relação a quantidade de células pneumocócicas aderidas quando a infecção foi realizada com MOI 100 (recuperadas $3,4 \times 10^5$ UFC) ou MOI 500 (recuperadas $3,6 \times 10^5$ UFC). Diante desses dados estabelecemos, para este estudo, a utilização do MOI 100, uma vez que quando do uso de MOI 500 foi observado que as células começaram a apresentar efeito citotóxico, com descolamento do tapete celular.

A Figura 5.11.2 demonstra o valor de IMF obtido para as células A549 incubadas com os pneumococos marcados com o fluorocromo FITC, e/ou com os pneumococos marcados e pré-tratados com os anticorpos policlonais, gerados em camundongos, contra as proteínas recombinantes.

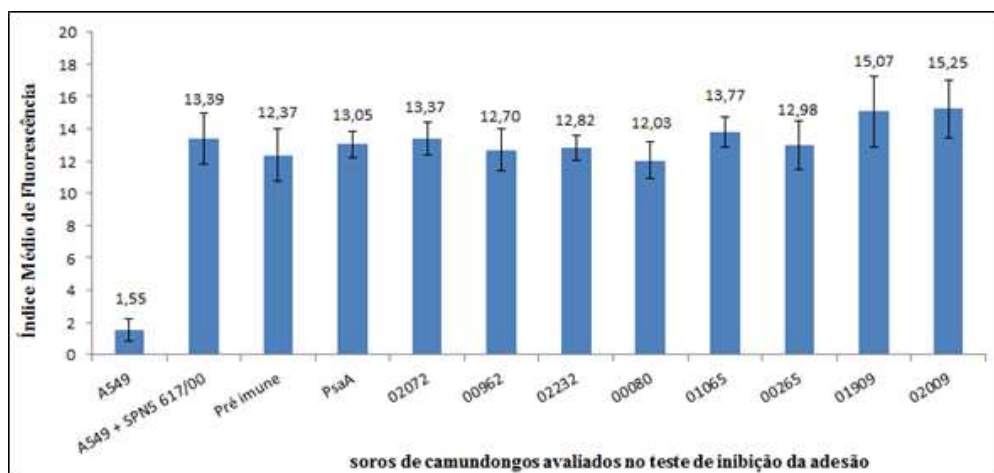


Figura 5.11.2: Índice médio de fluorescência obtido a partir da análise de citometria de fluxo para estudo da inibição da adesão de pneumococos às células A549 utilizando anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes de pneumococos. Os anticorpos policlonais gerados foram utilizados na diluição de 1:10 e o MOI de infecção da célula A549 foi de 1:100, sendo utilizada a concentração de 10^6 células A549 para cada 10^8 UFC de bactéria. Os experimentos foram realizados três vezes e a barra de erro é indicada na figura.

Em nosso estudo verificamos que nenhum dos anticorpos policlonais avaliados foram capazes de inibir a adesão do *S. pneumoniae* 5 617/00 às células A549 uma vez que não foi observada redução do IMF para as células infectadas com pneumococos pré-tratados com os anticorpos policlonais, quando comparamos com os controles negativos - células A549 infectadas com os pneumococos sem pré tratamento (A549 + *S. pneumoniae* 5 617/00) ou células A549 infectadas com os pneumococos pré-tratados com soro pré-imune (soro de animal não imunizado - soro pré-imune) (Figura 5.11.2).

Na literatura há diversos trabalhos descrevendo a participação de proteínas de pneumococos no processo de adesão desta bactéria às células eucarióticas A549 ou Detroit 562 (células de adenocarcinoma de nasofaringe). Como exemplo podemos citar: PcpA (Khan *et al.*, 2012)¹⁷⁹, PsaA (Romero-Steiner *et al.* 2003)¹⁶⁹; CbpA (Rosenow *et al.*, 1997)¹⁸⁰; BgaA (Limoli *et al.*, 2011)¹⁸¹; PavA (Pracht *et al.*, 2005)⁷⁶; PfbA (Yamaguchi *et al.*, 2008)⁸⁸.

Romero-Steiner *et al.* (2003)¹⁶⁹ demonstraram que anticorpos monoclonais e policlonais (gerados em coelhos) contra PsaA e soros de pacientes, que foram previamente avaliados quanto a presença de anticorpos contra PsaA, foram capazes de inibir a adesão de pneumococos (sorotipos 2, 4, 6A, 6B, 9V, 18C, 19A, 1F e 23F) às células Detroit 562. Berry & Paton (1996)¹⁸² e McAllister *et al.* (2004)¹⁸³ também demonstraram que cepas de pneumococos mutantes em PsaA apresentam uma redução na aderência, “in vitro”, às células A549 bem como às células de nasofaringe em modelo animal (“in vivo”). Contudo, em nossos experimentos não conseguimos observar o mesmo fenômeno de inibição da adesão do pneumococo (*S. pneumoniae* 5 617/00) às células A549 quando usamos o anticorpo policlonal anti-PsaA produzido em nosso laboratório, embora tenhamos demonstrado a expressão e exposição da proteína na superfície da bactéria, pelos ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta, utilizando este mesmo anticorpo (ver dados nos itens 5.9 e 5.10).

No que diz respeito a acessibilidade da proteína PsaA aos anticorpos devemos levar em consideração a relação presença “versus” quantidade de cápsula polissacarídica expressa nas amostras de pneumococos. Estudos reportados por Rajam *et al.* (2008)⁶⁶ demonstraram que variantes transparentes de pneumococos, as quais apresentam reduzida quantidade de cápsula polissacarídica, demonstraram melhor aderência às células epiteliais da nasofaringe em modelos “in vitro” e “in vivo”. Para explicarmos a incapacidade dos anticorpos policlonais, produzidos contra PsaA e contra as demais proteínas avaliadas neste estudo, de bloquear e/ou reduzir a adesão de *S. pneumoniae* 5 617/00 às células A549, formulamos algumas hipóteses. A primeira seria de que as proteínas recombinantes produzidas poderiam não estar na conformação ideal, tendo produzido anticorpos não funcionais em relação à capacidade de bloquearem a adesão bacteriana. É importante salientar que a grande maioria dos anticorpos policlonais produzidos foram contra porções das proteínas alvo, esse fato poderia estar relacionado à não inibição da ligação das bactérias às células alvo. Contudo esses anticorpos foram capazes de marcar as proteínas expressas na superfície das células íntegras nos experimentos de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta. A segunda seria em relação à quantidade de cápsula polissacarídica expressa pela cepa avaliada neste estudo, uma vez que não realizamos ensaios preliminares para identificarmos se a amostra é uma variante

opaca ou transparente, isso consequentemente influenciaria na capacidade de adesão da bactéria, assim como na acessibilidade dos anticorpos às proteínas em estudo. Em nosso estudo demonstramos que quando da infecção de células A549 com 10^8 UFC da amostra *S. pneumoniae* 5 617/00, apenas cerca de $3,5 \times 10^5$ UFC foram capazes de aderir, ou seja, a amostra de pneumococo demonstrou baixa capacidade de adesão às células (percentual menor do que 0,5%), no entanto não testamos outras cepas de pneumococos, utilizando a metodologia de citometria de fluxo, para avaliarmos o percentual de adesão às células A549. A terceira seria em relação ao próprio nível de expressão das proteínas alvos na superfície das células pneumocócicas ou na acessibilidade destas proteínas aos anticorpos, que poderia interferir na capacidade de inibição da adesão da cepa de *S. pneumoniae* 5 617/00 às células A549.

Sabemos que os pneumococos utilizam diversas adesinas para se ligarem às células do hospedeiro. Assim, caso alguma proteína em nosso estudo demonstre um fraco papel na adesão bacteriana, pode ser que outras adesinas tenham compensado esta baixa inibição. Além disso os pneumococos também se ligam às células epiteliais através de resíduos de fosforilcolina na sua parede celular, ou por meio de pili, ou utilizando os MSCRAMMs (componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas na matriz), ou por meio de diversas outras proteínas que estão na superfície bacteriana, entre outros (Bergmann & Hammerschmidt, 2006; Kline *et al.*, 2009; Paterson & Orihuela, 2010)^{184; 185; 186}.

Gosink *et al.* (2000)¹⁸⁷ demonstraram que uma cepa mutante de pneumococo em CbpE (02232) apresentou redução, em cerca de 10 vezes, na capacidade de colonizar a nasofaringe de ratos após 48 h de infecção, quando comparada com a cepa selvagem. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que essa cepa mutante apresentou uma redução de 70% na capacidade de se aderir às células Detroit 562 na temperatura de 30°C. Attali *et al.* (2008)¹⁶⁰ descreveram que a CbpE é um receptor para plasminogênio humano, demonstrando que uma cepa mutante nesta proteína, quando comparada com a cepa tipo selvagem, apresentou um reduzido nível de ligação à plaminogênio e ativação de plasmina, assim como uma reduzida habilidade de atravessar a matriz extracelular em modelo “in vitro”. Além disso, nos trabalhos de Attali *et al.* (2008) e Frolet *et al.* (2010)^{160; 188}, foi demonstrada a capacidade da CbpE em se ligar às proteínas de matriz extracelular. Todos estes dados, em conjunto, contribuem para elucidar o papel desta proteína no processo de adesão do pneumococo. No entanto, em nosso estudo, não conseguimos demonstrar a inibição ou a diminuição da adesão do pneumococo às células A549 utilizando anticorpo policlonal produzido em camundongo contra essa proteína recombinante. As mesmas hipóteses propostas anteriormente para a não inibição da adesão

utilizando o anticorpo policlonal anti-PsaA e os demais anticorpos policlonais gerados anti as proteínas recombinantes, podem ser aqui aplicadas, ou seja, a geração de anticorpos não funcionais em relação à capacidade de inibir a adesão pneumocócica às células eucarióticas, a quantidade de cápsula expressa pela bactéria, podendo influenciar na adesão e na acessibilidade dos anticorpos e o nível de expressão das proteínas na superfície do pneumococo.

Embora tenhamos verificado que nenhum dos anticorpos policlonais gerados contra as proteínas recombinantes tenha sido capaz de inibir a adesão de *S. pneumoniae* 5 617/00 às células A549, não podemos descartar por completo uma possível participação destas proteínas no processo de adesão. Essa argumentação será reforçada pelo estudo de interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular.

5.12. ELISA para estudo da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular

S. pneumoniae expressa diversas adesinas que se ligam a proteínas de matriz extracelular, permitindo ao patógeno interagir e se ligar às células do hospedeiro, bem como com proteínas do plasma humano. Diversos trabalhos têm utilizado proteínas de matriz extracelular para a caracterização das proteínas de pneumococos, incluindo os estudos com as proteínas PfbA (Yamaguchi *et al.*, 2008), α -enolase (Bergmann *et al.*, 2001), PspC (Dave *et al.*, 2001), PspA (Hammerschidt *et al.*, 1999), Hic (Janulczyk *et al.*, 2008) e CbpE (Attali *et al.*, 2008; Frolet *et al.*, 2010)^{160; 188; 189; 190; 191; 192}. Os mecanismos de virulência que levam os pneumococos a passarem do estágio de colonização para invasão não estão totalmente esclarecidos e compreendidos. No entanto sabemos que a proliferação da infecção requer a penetração na matrix extracelular (Attali *et al.*, 2008)¹⁶⁰. Outros patógenos também são capazes de interagirem com proteínas de matrix extracelular, contribuindo para a patogênese das infecções causadas por esses microrganismos (Choi *et al.*, 2001 e 2007; Yang *et al.*, 2014)^{193; 194; 195}.

A matriz extracelular é a parte do tecido animal que proporciona suporte estrutural para as células. Essa matriz inclui a matriz intersticial, que se encontra entre as células, e a membrana basal sobre a qual as células epiteliais descansam. A matriz é composta por proteínas glicosiladas, glicosaminoglicanos e polissacarídeos, que juntos formam uma rede fibrosa que armazena água e fatores de crescimento. Diversas são as proteínas que compõem esta matriz extracelular, dentre elas podemos citar o colágo tipo IV, a laminina e a fibronectina, proteínas utilizadas em nosso estudo (Figura 5.12.1). Os colágenos são as principais proteínas da matrix extracelular e há diversos tipos descritos, sendo que o tipo IV é

um colágeno formador de rede sendo o principal constituinte da lâmina basal. A laminina é uma glicoproteína que também está presente na lâmina basal, sendo que esta estrutura apresenta funções estruturais, filtrantes, determina a polaridade e influencia no metabolismo das células, entre outras. A fibronectina por sua vez é uma glicoproteína adesiva extracelular que auxilia a ligação das células à matrix extracelular (Alberts *et al.*, 1997)¹⁹⁶. O fibrinogênio é uma glicoproteína presente no plasma e está envolvido nas etapas finais da coagulação como precursor de monômeros de fibrina (Frolet *et al.*, 2010)¹⁸⁸.

Na Figura 5.12.1 demonstramos o perfil de interação das proteínas recombinantes de pneumococos, avaliadas neste estudo, com as proteínas de matriz extracelular acima descritas.

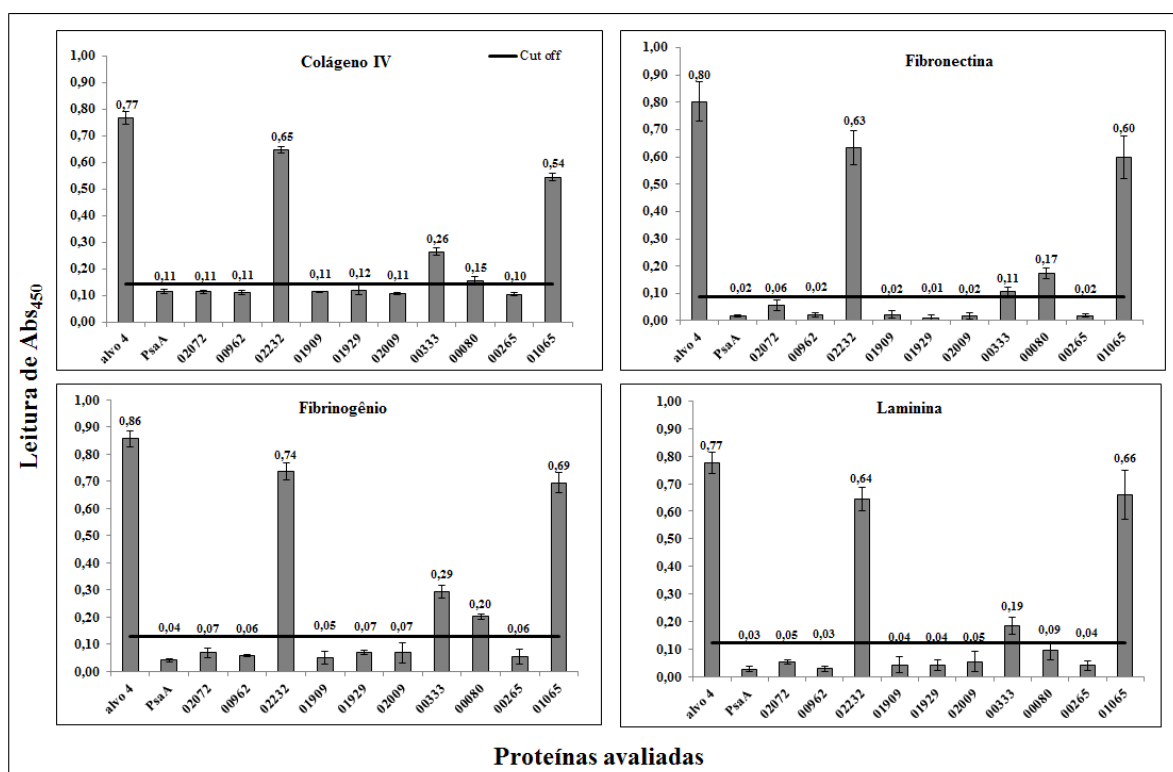


Figura 5.12.1: Avaliação da interação das proteínas recombinantes de pneumococos com proteínas de matriz extracelular por meio de ELISA. As proteínas de pneumococos avaliadas estão indicadas no eixo dos x e a leitura em Abs₄₅₀ no eixo dos y. As proteínas de matriz extracelular testadas estão descritas na parte superior dos gráficos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a barra de desvio padrão é indicada. A linha em preto indica o valor de “cut off”.

Como controle positivo em nossos testes utilizamos uma porção da proteína LigB domínios repetitivos 7-11 que compreende os aminoácidos 582 a 943 (denominado de alvo 4) de *Leptospira interrogans* sorovar Lai, a qual já foi previamente clonada e expressa em nosso laboratório e descrita quanto a sua capacidade de interagir com proteínas de matriz extracelular (Choy *et al.*, 2007 e 2011; Lin *et al.*, 2010)^{193; 194; 197}. Como controle negativo utilizamos também um fragmento da proteína LigB domínios 2-11 que compreende os

aminoácidos 131 a 649 de *L interrogans* sorovar Pomona a qual não apresenta interação com essas proteínas de matriz (Lin *et al.*, 2010)¹⁹⁷. Não foram detectadas reações inespecíficas entre o anticorpo conjugado anti-IgG de camundongo, ligado à peroxidase, com as proteínas testes de pneumococos, sendo que as médias das leituras obtidas na Abs₄₅₀ foram entre 0,05 e 0,1; estas médias foram consideradas como sendo o branco. Para o cálculo do “cut off” subtraímos as leituras médias de Abs₄₅₀ dos controles negativos das leituras médias obtidas do branco, a seguir a este valor somamos duas vezes o desvio padrão. Os seguintes “cut off” foram estabelecidos, neste ensaio, para as condições aqui descritas: 0,14 para colágeno IV; 0,13 para fibrinogênio; 0,12 para laminina e 0,09 para fibronectina.

Dentre as dez proteínas de pneumococos avaliadas em nosso estudo verificamos que 02232 e 01065 apresentaram uma alta interação com as quatro proteínas de matriz avaliadas; enquanto que as proteínas 00080 e 00333 demonstraram baixa interação. Vale ressaltar, que os conceitos descritos de alta (ou forte) e baixa (ou fraca) interação são relativos ao padrão de interação demonstrada pela proteína controle (ligB domínios repetitivos 7-11 - alvo 4). As demais proteínas de pneumococos avaliadas neste estudo não demonstraram interação com o conjunto de proteínas de matriz extracelular avaliadas.

A proteína 02232 (CbpE), já descrita na literatura, é uma proteína ligadora de colina e atua como uma importante receptora de plasminogênio humano, sendo que cepas mutantes em *cbpE* demonstraram um reduzido nível de ligação a plasminogênio e ativação de plasmina bem como demonstraram reduzida habilidade de atravessar a matrix extracelular em modelo “in vitro” (Attali *et al.*, 2008)¹⁶⁰. Neste estudo foi demonstrado que essa proteína apresenta uma fraca interação com as proteínas fibronectina, fibrinogênio e colágeno IV quando comparada com as proteínas laminina e plasminogênio. Frolet *et al.* (2010)¹⁸⁸ demonstraram que CbpE é capaz de interagir fortemente com as proteínas laminina e plasminogênio, assim como é capaz de se ligar a proteína fibrinogênio, porém não se liga às proteínas fibronectina e colágeno IV, ao contrário do demonstrado por Attali *et al.* (2008)¹⁶⁰. Em nosso estudo verificamos que essa proteína foi capaz de interagir fortemente com as proteínas laminina e fibrinogênio, como descrito nos trabalhos citados anteriormente. Porém, ao contrário do que foi descrito por Attali *et al.* (2008)¹⁶⁰ e Frolet *et al.* (2010)¹⁸⁸, verificamos que essa proteína demonstrou uma forte interação com a proteína fibronectina, quando comparamos com os valores médios de Abs₄₅₀ obtidos no controle positivo. Em relação a interação dessa proteína com colágeno IV, Attali *et al.* (2008)¹⁶⁰ demonstraram haver uma fraca interação, ao passo que Frolet *et al.* (2010)¹⁸⁸ demonstraram não haver interação entre estas proteínas. Em nosso estudo verificamos que CbpE foi capaz de interagir, fortemente, com a proteína colágeno IV e em nível semelhante à interação demonstrada com a proteína fibronectina, quando comparada

com o controle positivo. Esses dados, em conjunto, apontam para a importância do papel dessa proteína na interação com as células do hospedeiro, atuando no processo de adesão bacteriana como demonstrado por Gosink *et al.* (2000)¹⁸⁷. Tendo em vista que a proteína 01065 apresentou padrões de interação, com as proteínas de matriz extracelular, equivalentes aos padrões demonstrados pela proteína CbpE, podemos supor que essa proteína possa estar envolvida no processo de adesão e invasão. Contudo, até o momento não encontramos dados na literatura que descrevam o papel de proteínas da família quinase e sua interação com proteínas de matriz extracelular.

As proteínas 00333 e 00080, embora tenham apresentado uma interação mais fraca com as proteínas de matriz extracelular avaliadas, talvez possam também desempenhar algum papel no processo de adesão do pneumococo às células hospedeiras. Entretanto, não encontramos na literatura dados que descrevam o papel destas proteínas no processo de adesão bacteriana.

A proteína 02072 (PiuA), descrita na literatura, foi capaz de induzir proteção em camundongos contra desafio sistêmico (Brown *et al.*, 2001)⁷⁰ bem como contra desafio intranasal (Jomaa *et al.*, 2006)⁷², sendo sua capacidade protetora correlacionada com a funcionalidade dos anticorpos gerados, os quais demonstraram capacidade opsonizante (Jomaa *et al.*, 2005)¹⁵¹. Contudo, o envolvimento dessa proteína no processo de adesão, até o momento, não foi descrito. Os dados obtidos em nosso estudo corroboram com os da literatura no que diz respeito ao fato dessa proteína não ser capaz de se ligar às proteínas de matriz extracelular. Esse resultado demonstrou que essa proteína possivelmente não desempenha papel no processo de adesão do pneumococo ao hospedeiro, contudo constitui um importante candidato vacinal pela sua capacidade de induzir proteção.

A caracterização das interações entre as proteínas de *S. pneumoniae* com proteínas de matriz extracelular permite melhor compreensão do papel dessas proteínas no processo de aderência, na colonização do hospedeiro e na patogênese das infecções causadas por este microrganismo. A ligação às proteínas de matriz extracelular funciona como uma ponte de ligação entre o microrganismo e as células do hospedeiro, favorecendo a aderência e a formação de biofilme, uma vez que durante o processo de lesão tecidual várias dessas proteínas são expostas (Brown *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2006)^{70; 72}. Durante uma infecção a resposta do hospedeiro inclui a produção e ativação de matrix-metaloproteases. Estas enzimas são capazes de degradar a matriz extracelular e, portanto, desempenham importantes funções na remodelação dos tecidos, na proliferação celular, na apoptose e na defesa do hospedeiro. Assim a ativação dessas metaloproteases durante a infecção pode ser importante mecanismo para a liberação de bactérias aderidas, podendo ser benéfico, por exemplo, permitindo o

“clearance” bacteriano a partir de bactérias aderidas ao mucociliar dos pulmões. Porém em outros casos pode ser prejudicial, facilitando a disseminação do microrganismo dentro dos tecidos infectados (Paterson & Orihuela, 2010) ¹⁸⁶.

5.13. Avaliação da presença e do grau de identidade nucleotídico e proteico entre amostras de origem clínica de pneumococos

A presença de antígenos que sejam expostos e conservados entre os diferentes sorotipos de pneumococos constituem potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Assim, tendo em vista o exposto acima, os alvos selecionados neste estudo foram avaliados quanto a sua presença em amostras de origem clínica, isolados no Brasil. Além disso, também avaliamos o grau de identidade nucleotídica e proteica destes alvos, em conjunto com os dados disponíveis no “GenBank”.

Para verificarmos a presença dos genes, avaliados neste estudo, nas amostras de pneumococos, realizamos o cultivo das bactérias, a extração do ADN e a seguir PCR e sequenciamento nucleotídico.

O ADN extraído de *Staphylococcus aureus* foi utilizado como controle negativo nas reações de PCR. O gene *psaA*, o qual é bem caracterizado e presente em todas as amostras de pneumococos (Morrison *et al.*, 2000) ⁶⁵ foi utilizado como controle positivo em nosso estudo.

Para calcularmos o percentual médio de identidade nucleotídica e proteica entre as sequências disponíveis no “GenBank” e aquelas geradas em nosso estudo, a partir do sequenciamento dos genes amplificados, foi gerada uma matriz de identidade e a partir desta matriz foi calculada a média de identidade entre as amostras. A média foi calculada somando-se os percentuais de identidade contidos na matriz e, após, dividindo-se o resultado do somatório pelo número de células da matriz.

Na Tabela 5.13.1 demonstramos a presença dos alvos analisados entre as 51 amostras de pneumococos avaliadas neste estudo (ver descrição das amostras no Anexo 5), assim como o grau de identidade entre as sequências nucleotídicas e proteicas entre as amostras de *S. pneumoniae* (analisadas neste estudo e aquelas disponíveis no “GenBank”), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* Uo5 e *Streptococcus pseudopneumoniae* IS7493 (esses três últimos disponíveis no “GenBank”).

Tabela 5.13.1: Presença e grau de conservação dos alvos em amostras de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* B6, *Streptococcus oralis* Uo5 e *Streptococcus pseudopneumoniae* IS7493

Gene em <i>S. pneumoniae</i> 5 617/00	Presença em cepas de <i>S. pneumoniae</i> (este estudo)	Conservação de nt ^a e de aa ^b (média % ID ^c) entre <i>S. pneumoniae</i>	Conservação de nt e de aa (média % ID) entre <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493	Conservação de nt e de aa (média % ID) entre <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. mitis</i> B6	Conservação de nt e de aa (média % ID ^d) entre <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. oralis</i> Uo5
00062	51	98,4 / 99,6	96,4 / 99,4	95,5 / 99,4	84,2 / 94
00265	51	99,6 / 99,9	98 / 99,3	89,3 / 96,2	78 / 90,7
00271	51	99,5 / 99,9	96,8 / 98	93, / 95	- ^d
00589	51	99,4 / 99,6	98,6 / 98,9	92,7 / 97,8	86,6 / 95,9
00962	51	99,8 / 100	92,9 / 94,7	83,4 / 84,2	84,3 / 85,5
01065	51	93,3 / 93,6	90,5 / 91,5	79,1 / 82,1	81,8 / 86,1
01195	51	99,6 / 99,1	94,5 / 94,4	94,2 / 94,7	80,6 / 80,8
01909	51	99,6 / 100	99 / 100	94,7 / 98,8	92,5 / 99,2
01929	50	98,6 / 99	93,5 / 97,3	92,9 / 97,8	-
01967	51	92,7 / 92,7	78,6 / 78,5	77,8 / 78,4	56,4 / 57,4
02009	51	98,3 / 98,6	91,9 / 96,8	93,5 / 100	72 / 79,6
02072	51	99,5 / 99	94,1 / 95,4	-	-
02232	51	96,7 / 96	96,1 / 96,2	92,1 / 92,1	-
00333	49	/ 96	/ 95	/ 95	/ 81
00080	50	/ 96	/ 92	/ 92	/ 89
00397	51	/ 99	/ 96	/ 93	/ 78
00787	51	/ 96	/ 93	/ 91	/ 86

^ant – nucleotídeo; ^baa – aminoácido, ^cmedia % ID – media percentual de identidade, ^dgene ou proteína não encontrada na espécie analisada

Verificamos que, dos 17 genes avaliados neste estudo, 14 encontram-se presentes em todas as amostras de pneumococos de origem clínica avaliados. No entanto, alguns genes não foram amplificados entre os amostras avaliadas, entre eles estão: 01929 não amplificou na amostra 19F ATCC 49619, 00333 não amplificou nas amostras 14 (2721) e 35B (700) e 00080 não amplificou na amostra 19F (720). Uma das limitações nesse estudo é que a ausência dos genes foi baseada em PCR, assim, os resultados negativos não necessariamente equivalem a ausência dos genes nas amostras, pois podem existir diferenças nucleotídicas entre a sequência de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e as sequências gênicas.

Um ponto que chamamos a atenção é que quando geramos o banco de dados contendo as proteínas de *Streptococcus* sp., as sequências genômicas de *S. mitis*, *S. oralis* e *S. pseudopneumoniae* não estavam disponíveis no “GenBank”. Contudo hoje existem mais de 11 genomas de *S. oralis* e *S. mitis* e 3 de *S. pseudopneumoniae* disponíveis, incluindo genomas completamente sequenciados e projetos WGS, o que nos permitiu verificar que os genes selecionados neste estudo encontram-se distribuídos entre estas espécies bacterianas.

Os pneumococos são membros do grupo Viridans e apresentam uma alta relação genética com as espécies de *S. mitis* e *S. oralis*. No entanto enquanto os pneumococos são patógenos clássicos, *S. mitis* e *S. oralis* são usualmente patógenos comensais das membranas

mucosas, que ocasionalmente podem causar doenças oportunistas em pacientes imunocomprometidos, particularmente naqueles que apresentam transplante de válvulas cardíacas, de órgãos ou câncer (Denapaite *et al.*, 2010; Reichmann *et al.*, 2011)^{198; 199}.

O *S. pseudopneumoniae* foi recentemente descrito como membro do grupo Mitis do grupo Viridans, sendo fenotipicamente e geneticamente relacionado com *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *S. oralis*. Cepas de *S. pseudopneumoniae* foram isoladas do trato respiratório inferior e são responsáveis por causarem infecções em pacientes com histórico de doença pulmonar obstrutiva crônica (Keith *et al.*, 2006; Mohammadi *et al.*, 2012)^{200; 201}, embora o seu significado clínico ainda seja desconhecido (Park *et al.*, 2012)²⁰².

Interessante observar que o gene *01909* foi identificado, por “blastn” na espécie *S. pasteurianus* ATCC 43144 (*S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*). Embora seja comensal, a espécie *S. pasteurianus* é capaz de causar sepse neonatal e meningite em crianças e adultos (Lin *et al.*, 2011)²⁰³.

Aproximadamente 20 diferentes espécies de *Streptococcus* sp. residem na nasofaringe, muitos dos quais são naturalmente transformáveis e, portanto, são capazes de trocar material genético com os pneumococos (Majewski *et al.*, 2000)²⁰⁴. Assim, algum grau de similaridade é esperado que ocorra entre espécies do grupo Viridans, como *S. mitis*, *S. oralis* e *S. pneumoniae* (Kilian *et al.*, 2008)²⁰⁵, sendo que o grande número de genes homólogos associados à virulência, entre estas espécies, leva a um interessante questionamento biológico no contexto dos diferentes comportamentos e potenciais patogênicos destes microrganismos no mesmo nicho.

A razão para a grande diferença no potencial de virulência entre espécies do grupo Mitis ainda não é bem compreendida. Vários genes são descritos como sendo codificadores de fatores de virulência em *S. pneumoniae* com base em ensaios de infecção em animais. No entanto, muitos deles estão presentes em *S. mitis* B6, por exemplo (Denapaite *et al.*, 2010)¹⁹⁸. A expressão desses genes pelas espécies comensais evidencia a transferência gênica horizontal (HGT). Hakenbeck e colaboradores *apud* Kilian *et al.* (2008)²⁰⁵ sugerem que há uma “suave transição” entre essas espécies.

Tendo em vista a presença de genes de pneumococos nas espécies *S. oralis* e *S. mitis*, em nosso estudo incluímos as amostras de *S. oralis* ATCC 10557 e *S. mitis* ATCC 49456. A presença dos genes em cepas de *S. oralis* e *S. mitis* avaliadas neste estudo, bem como a presença das proteínas avaliadas nos genomas disponíveis no “GenBank” estão descritas no Anexo 12.

Diversos estudos têm reportado a presença e distribuição de genes e proteínas de pneumococos em amostras do grupo Mitis, sendo que muitos dos fatores de virulência de

pneumococos, os quais estão sendo considerados como potenciais candidatos vacinais e que poderiam proporcionar uma proteção cruzada entre os sorotipos (Darrieux *et al.*, 2013; Miyaji *et al.*, 2013) ^{61; 62}, estão amplamente distribuídos entre *S. mitis* e *S. oralis*. Por exemplo: Madhour *et al.* (2011) ²⁰⁶ demonstraram que muitas proteínas consideradas potenciais candidatos vacinais, como PavA, BgdA e NanA estão presentes em *S. oralis* e *S. mitis*, incluindo CbpD (01967), uma das proteínas avaliadas em nosso estudo. Whalan *et al.* (2006) ⁷¹ identificaram o gene *piuA* (02072) em 22 cepas de pneumococos isoladas de diferentes países, bem como em cepas de *S. oralis* e *S. mitis*. Johnston *et al.* (2010) ²⁰⁷ também identificaram a presença de vários genes pneumocócicos em *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae*, incluindo *licC* (00062, também avaliado em nosso estudo) e *cbpD*. Donati *et al.* (2010) ²⁰⁸ descreveram a presença de proteínas pneumocócicas de superfície ou conhecidas por estarem envolvidas em virulência e interação com o hospedeiro, em *S. mitis* e *S. oralis*, incluindo CbpE e CbpD. Em nosso estudo igualmente verificamos a presença de *cbpe* em *S. mitis* ATCC 49456 mas não em *S. oralis* ATCC 10557. Entretanto, ao contrário de Donati *et al.* (2010) ²⁰⁸, verificamos que *cbpD* está presente em ambas as espécies avaliadas, *S. oralis* e *S. mitis*. No entanto, como exposto anteriormente, a ausência dos genes é baseada em PCR e a não amplificação gênica não significa que o gene não esteja presente na espécie.

É importante ressaltar que vacinas de subunidade baseadas em moléculas que codificam para genes com alelos variáveis, que, portanto, codificam para proteínas variáveis que não são capazes de induzirem uma resposta sorológica cruzada, podem sofrer mutações. Além disso, genes que codificam para alvos não essenciais usados para a vacinação podem ser descartados sob o efeito da pressão do sistema imune, a menos que eles confirmem uma vantagem seletiva para as cepas que os carregam (Donati *et al.*, 2010) ²⁰⁸. Devido a isso é importante o estudo de proteínas que sejam amplamente distribuídas e conservadas entre os diversos sorotipos de pneumococos e que possam atuar como alvos vacinais.

Em relação à identidade nucleotídica verificamos que os genes avaliados neste estudo demonstraram um alto grau de conservação entre as amostras de *S. pneumoniae*, em torno de 98% de identidade, exceto para os genes 01065, 01967 e 02232, os quais apresentaram graus de identidade em torno de 93,3%, 92,7% e 96,7%, respectivamente. Igualmente observamos um alto nível de conservação nucleotídica, para a maioria dos alvos avaliados, entre as amostras de *S. pneumoniae* e *S. mitis* B6 (>92%), entre *S. pneumoniae* e *S. oralis* Uo5 (>80%) e entre *S. pneumoniae* e *S. pseudopneumoniae* IS7493 (>90%). Entretanto verificamos que para os genes 00265, 00962, 01065 e 01967 a identidade foi de 89,3%, 83,4%, 79,1% e 77,8%, respectivamente, entre as amostras de *S. pneumoniae* e *S. mitis* B6.

Os genes 00265, 01967 e 02009 demonstraram uma identidade nucleotídica de 78%,

56,4% e 72%, respectivamente, entre as amostras de *S. pneumoniae* e *S. oralis* Uo5. O gene 01967 apresentou identidade de 78,6% entre amostras de *S. pneumoniae* e *S. pseudopneumoniae* IS7493, enquanto que o gene 01909, presente em *S. pasteurianus*, apresentou grau de identidade de 86,9% com as amostras de *S. pneumoniae*.

Donati *et al.* (2010)²⁰⁸ descreveram um alto grau de conservação nucleotídica para o gene 01967 (98,94%). Em nosso trabalho observamos uma identidade nucleotídica de 92%, próxima a descrita por Donati *et al.* (2010)²⁰⁸, entre as amostras de pneumococos avaliadas. No entanto, foi observada uma variabilidade entre algumas amostras as quais demonstraram um menor grau de identidade. Essa diferença em termos de conservação nucleotídica, e conseqüentemente proteica, pode ser explicada pela presença de dois domínios SH3 em CbpD em alguns sorotipos, enquanto que outros apresentaram um domínio SH3. O domínio SH3 é responsável por ligar a proteína ao peptidoglicano na parede celular (Eldholm *et al.*, 2009)⁶⁰. Em nosso estudo as amostras que apresentaram um domínio foram os sorotipos 3 (4 amostras), 5 (3 amostras), 7C (1 amostra), 9N (1 amostra) e 14 (1 amostra). Também verificamos que as amostras de *S. mitis* B6, *S. oralis* Uo5 e *S. pseudopneumoniae* IS7493 apresentaram somente um domínio SH3. No entanto, em nosso estudo não podemos estabelecer correlações entre a presença de um ou dois domínios SH3, entre os diferentes sorotipos, com seus complexos clonais ou com a maior ou menor capacidade de causarem colonização ou doença invasiva, por exemplo, pois não dispomos de dados de MLST (“multilocus sequence typing”) para todas as amostras avaliadas assim como não foram realizadas avaliações “in vivo” e “in vitro” com os sorotipos acima descritos.

Em relação à identidade proteica também observamos um alto grau de conservação das sequências de aminoácidos nos alvos avaliados. Entre as amostras de *S. pneumoniae* o grau de identidade proteica foi >96%, exceto para as proteínas 01065 e 01967, as quais demonstraram identidade de 93,6% e 92,7%, respectivamente.

O grau de identidade proteica dos alvos selecionados entre a espécie de *S. pseudopneumoniae* IS7493 e as amostras de *S. pneumoniae* foi alta (>92%), exceto para a proteína 01909 que demonstrou 78,5%.

Com relação ao grau de identidade proteica dos alvos entre *S. mitis* B6 e as amostras de *S. pneumoniae*, verificamos que a maioria demonstrou uma alta conservação (>95%), exceto para as proteínas 00962, 01065, 01967, 02232, 00080, 00397 e 00787 as quais demonstraram identidades de 84,2%, 82,1%, 78,4%, 92,1%, 92%, 93% e 91%, respectivamente.

O gene que codifica a proteína 02072 não foi identificado no genoma de *S. mitis* B6, mas essa proteína está presente em outros genomas de *S. mitis* (projetos WGS) (ver Anexo 12) com uma identidade >91%.

Com relação ao grau de identidade proteica dos alvos entre *S. oralis* Uo5 e as amostras de *S. pneumoniae*, verificamos que o grau de identidade foi >90% para as proteínas 00062, 00265, 01909 e 00589, enquanto que para as proteínas 00962, 01065, 01195, 00333, 00080, 00387 e 00787 o grau de identidade foi entre 80% e 86%. As proteínas que demonstraram menor grau de conservação foram as 01967 e 02009, com 57,4% e 79,6% de identidade, respectivamente.

Os genes que codificam as proteínas 00271 e 02072 não foram detectadas em *S. oralis* Uo5, mas essas proteínas estão presentes em outros genomas de *S. oralis* (projetos WGS) (ver Anexo 12) com um grau de identidade >64% e >91%, respectivamente.

A proteína 01909 apresentou um grau de identidade de 98% entre a amostra de *S. pasteurianus* e as amostras de *S. pneumoniae*.

Assim, verificamos que os alvos selecionados neste trabalho encontram-se amplamente distribuídos entre os diferentes sorotipos de pneumococos e apresentam uma alta identidade nucleotídica e proteica; sendo estas características importantes para alvos que pretendem ser utilizados como vacinas. Portanto todos os alvos aqui avaliados seriam, sob este aspecto, bons candidatos vacinais.

5.14. Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas geradas não foram enraizadas e, portanto, demonstram somente as relações filogenéticas entre genes/proteínas sem assumir o sentido evolutivo em relação ao tempo ou ordem de divergência.

Verificamos que as árvores filogenéticas (Anexo 13) baseadas nos alinhamentos dos ADN e das sequências proteicas para os alvos analisados demonstram que *S. oralis* é mais distante de *S. pneumoniae* enquanto que *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* são mais próximos. Isso pode ser verificado quando avaliamos o grau de identidade, nucleotídico e proteico, entre as amostras avaliadas. Os alvos analisados demonstraram uma alta identidade entre as amostras de *S. pneumoniae* (>96%), assim como entre *S. pneumoniae* e *S. pseudopneumoniae* (>96%), entre *S. pneumoniae* e *S. mitis* (em torno de 92%) e entre *S. pneumoniae* e *S. oralis* (em torno de 85%), sugerindo que os alvos não são muito divergentes entre estas amostras. Verificamos que todas as cepas de pneumococos formaram um grande grupo filogenético relacionado entre si, estando *S. pseudopneumoniae* incluído neste grupo, ao passo que *S. oralis* e *S. mitis* (para alguns alvos avaliados) ficaram localizados separados do “cluster” formado pelos pneumococos; no entanto todas as espécies são altamente relacionadas. Verificamos que dentro do grupo filogenético formado pelos pneumococos ocorreu a presença de outros grupos menores, em virtude das pequenas variações nas sequências nucleotídicas e

proteicas apresentadas pelos alvos; alguns destes grupos estão relacionados a determinados sorotipos, mas esta observação não pode ser estendida para todos os alvos avaliados. Assim, em virtude da pequena divergência entre o alvos não foi possível observarmos a formação de grupos filogenéticos consistentes. Esse fato era esperado uma vez que as proteínas foram selecionadas por serem alvos conservados nos pneumococos.

Outros estudos têm relatado as relações filogenéticas entre os genes presentes em pneumococos e nas espécies relacionadas *S. mitis*, *S. oralis* e *S. pseudopneumoniae* (Whalan *et al.*, 2006; Donati *et al.*, 2010)^{71; 208}. Nesses estudos os autores demonstraram que cepas de *S. oralis* são mais divergentes, enquanto que cepas de *S. mitis* são mais relacionadas à *S. pneumoniae*. Donati *et al.* (2010)²⁰⁸ sugeriram que *S. pneumoniae* é um clone bem sucedido e adaptado (em relação ao seu potencial patogênico) de uma população maior que inclui numerosos linhagens de *S. mitis*.

Portanto, os dados obtidos em nosso estudo concordam com os descritos na literatura, demonstrando que *S. oralis* é menos relacionado à *S. pneumoniae*, enquanto que *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* são mais relacionados geneticamente aos pneumococos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Neste trabalho selecionamos, amplificamos, clonamos e expressamos, em sistema *E. coli*, 19 proteínas de pneumococos, as quais demonstraram predição para localização sub-celular extracelular (de parte ou de toda a proteína), utilizando programas de bioinformática.

2. Das 19 proteínas expressas, 10 foram purificadas na forma solúvel.

3. Verificamos que todas as proteínas foram antigênicas, sendo capazes de gerar uma resposta imune com produção de anticorpos policlonais os quais reconheceram as proteínas recombinantes em ensaios de “immunoblotting”.

4. As proteínas 02232 e 02072 foram as que demonstraram antigenicidade mais elevada, ou seja, os anticorpos policlonais apresentaram titulações maiores (os anticorpos foram capazes de reconhecer estas proteínas em maiores diluições), quando comparadas com as proteínas 00080, 00333 e 01929, por exemplo.

5. Em relação à antigenicidade das proteínas recombinantes de pneumococos frente aos soros de pacientes com meningite pneumocócica observamos que as proteínas 02232 e 02072 foram as mais antigênicas, sendo reconhecidas por mais de 50% dos soros avaliados (23 e 17 soros, dos 24 avaliados, respectivamente), dados que corroboram com aqueles observados para a avaliação frente aos anticorpos policlonais produzidos nos camundongos. No entanto as proteínas 01065 e 01909, que demonstraram perfil de antigenicidade semelhante a das proteínas 02232 e 02072 quando avaliadas frente aos anticorpos policlonais produzidos em camundongos, não foram reconhecidas com o mesmo grau de antigenicidade pelos soros humanos, sendo reativas para 9 (01065) e 7 (01909) soros de pacientes, por outro lado, as proteínas 00333 e 01929 foram as menos antigênicas frente aos anticorpos policlonais gerados em camundongos e frente aos soros de pacientes, porém a proteína 00080 que demonstrou ser pouco antigênica frente ao anticorpo policlonal produzido em camundongo foi reconhecida por 11 (~45%) soros de pacientes. Portanto, não foi possível estabelecermos uma correlação entre o potencial antigênico das proteínas recombinantes frente aos anticorpos policlonais gerados em modelo animal com o potencial antigênico destas proteínas frente aos soros de pacientes apresentando meningite pneumocócica. Devemos levar em conta que a resposta de anticorpos pelos pacientes pode estar relacionada a vários fatores, tais como o nível de expressão da proteína, por parte da bactéria, durante a infecção, o quadro clínico desenvolvido pela doença pneumocócica (se é meningite, pneumoniae, otite ou outra infecção) e a apresentação das proteínas para o sistema imune. Além disso, é importante considerar o sorotipo causador de doença, pois em nosso trabalho observamos que existem

diferenças quanto a expressão/reconhecimento das proteínas pneumocócicas de superfície entre as diferentes amostras de pneumococos.

6. A presença de anticorpos em pacientes, contra as proteínas recombinantes de pneumococos avaliadas neste estudo, indica haver produção de uma resposta imune em humanos contra estes antígenos, embora esta resposta, por si só, não signifique que estes antígenos possam vir a ser protetores quando utilizados em uma composição vacinal. Os dados indicam que estas proteínas são expressas “in vivo”, são capazes de induzir a produção de anticorpos durante a infecção (meningite) e há reatividade cruzada entre os diversos sorotipos avaliados.

7. Empregando as metodologias de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta confirmamos “in vitro” os dados obtidos “in silico” os quais indicavam ser de superfície as proteínas selecionadas. Por meio da técnica de citometria de fluxo verificamos que as dez proteínas avaliadas neste estudo foram expressas na superfície dos dez sorotipos de pneumococos (1, 4, 5, 6B 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), exceto a proteína 00333 para a qual não houve marcação no sorotipo 7F. Por meio da técnica de imunofluorescência indireta igualmente confirmamos que as proteínas avaliadas foram expressas na superfície do *S. pneumoniae* 5 617/00.

8. Verificamos que os anticorpos gerados contra as proteínas recombinantes foram capazes de reconhecer as proteínas nativas na superfície de sorotipos heterólogos de pneumococos demonstrando a reatividade cruzada entre essas proteínas nos diferentes sorotipos.

9. Por meio da citometria de fluxo verificamos que as proteínas 02072, 00265 e 01909 foram as que apresentaram maior percentual de células marcadas, ao passo que as proteínas 00080 e 00333 foram as que apresentaram menor marcação nos sorotipos avaliados. Na discussão pontuamos que essa expressão diferencial das proteínas na superfície dos pneumococos pode ser devido a baixa expressão das proteínas na superfície bacteriana ou devido a acessibilidade diminuída aos anticorpos para estas proteínas nos sorotipos avaliados. No entanto, não realizamos estudos que possam distinguir entre essas duas hipóteses.

10. Em relação à capacidade de ligação das proteínas recombinantes as proteínas de matriz extracelular, demonstramos que quatro proteínas - 02232, 00333, 00080 e 01065 – foram capazes de interagir com as proteínas de matriz avaliadas, o que nos leva a especular que estes alvos possam ter alguma participação no processo de aderência do pneumococo às células do hospedeiro, indicando a importância destas proteínas como potenciais candidatos no desenvolvimento de uma vacina proteica.

11. Embora algumas proteínas de pneumococos tenham demonstrado ligação as

proteínas de matriz extracelular, em nosso estudo verificamos que os antiorpos policlonais gerados contra as proteínas recombinantes não foram capazes de inibir a adesão de *S. pneumoniae* 5 617/00 às células eucarióticas A549. Como o processo de adesão é um fenômeno complexo, envolvendo diversos fatores de virulência do patógeno e do hospedeiro, podemos especular que talvez a participação das proteínas selecionadas no processo de adesão “in vitro” seja fraca e/ou multifatorial.

12. Em relação a presença e o nível de conservação dos alvos selecionados, verificamos que os candidatos avaliados estão amplamente distribuídos entre amostras de origem clínica e apresentam alta identidade nucleotídica e aminoacídica. Porém os genes também foram encontrados em amostras de *Streptococcus* do grupo Mitis, como *S. oralis*, *S. mitis*, e também em *S. pseudopneumoniae*. Estas espécies são descritas na literatura como sendo altamente relacionadas geneticamente com pneumococos, com os quais compartilham vários fatores de virulência. Assim, nossos dados corroboram com aqueles descritos na literatura.

13. **Resumo das conclusões:** verificamos que as duas proteínas mais antigênicas em modelo animal, 02232 e 02072, também foram as mais antigênicas frente aos soros humanos de pacientes com meningite pneumocócica, sendo que a proteína 02072 foi uma das que apresentou maior percentual de células marcadas na superfície bacteriana na análise de citometria de fluxo. Já as proteínas 00080, 00333 e 01929 que foram as menos antigênicas em modelo animal, igualmente demonstraram baixa antigenicidade frente aos soros humanos, exceto para a proteína 00080, bem como demonstraram baixo percentual de células marcadas na superfície bacteriana. Isso nos leva a inferir que embora algumas proteínas, como as 00080 e 00333, apresentem baixa antigenicidade em modelo animal e sejam pouco expressas na superfície bacteriana, ou que apresentam reduzida acessibilidade aos anticorpos, podem desempenhar papel importante na patogênese do microrganismo, uma vez que estas proteínas demonstraram ligação a proteínas de matriz extracelular. Além disso a proteína 00080 foi capaz de ser reconhecida por 45% dos soros humanos avaliados neste estudo.

14. **Conclusão final:** propomos que as proteínas 02232, 00080, 00333 e 01065 podem ser consideradas importantes alvos vacinais por serem expressas e expostas à superfície bacteriana e terem demonstrado interação com proteínas de matriz extracelular, podendo indicar algum papel destas proteínas no processo de adesão da bactéria às células do hospedeiro. Por outro lado não descartamos a possível importância das proteínas 02072 e 02009 no processo de infecção de pneumococo, em virtude de essas proteínas terem sido reconhecidas por mais de 41% dos soros de pacientes.

Como perspectivas propomos realizar: a) Estudo de adesão e inibição às células

eucarióticas A549 utilizando outros sorotipos de pneumococos, para reavaliarmos o potencial dos anticorpos policlonais gerados nos animais em inibir a adesão bacteriana a estas células; b) Ensaio de competição, utilizando as proteínas recombinantes, a fim de verificar o papel destas no processo de inibição de adesão bacteriana, complementando os ensaios de inibição de adesão utilizando os anticorpos policlonais gerados; c) Padronização da DL₅₀ em modelo murino para diferentes sorotipos bacterianos e testagem dos candidatos vacinais em modelo de sepsis e de pneumonia, utilizando diferentes adjuvantes; d) Padronização e estabelecimento de um correlato de proteção baseado no ensaio de opsonização a fim de verificar se as proteínas recombinantes são capazes de gerar anticorpos opsonizantes; e) Busca de novos antígenos proteicos que possam ser utilizados como potenciais candidatos vacinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; TRABULSI, L. R. *Streptococcus pneumoniae*. In: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 24, p.760.
- 2 ALONSODEVELASCO, E. et al. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 4, p. 591-603, Dec 1995. ISSN 0146-0749.
- 3 PLETZ, M. W. et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 3, p. 199-206, Sep 2008.
- 4 GARCÍA-SUÁREZ, M. E. M.; VÁZQUEZ, F.; MÉNDEZ, F. J. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: An update. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 8, p. 512-7, Oct 2006.
- 5 MEHR, S.; WOOD, N. *Streptococcus pneumoniae*--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatr Respir Rev**, v. 13, n. 4, p. 258-64, Dec 2012.
- 6 VARON, E. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. **Med Mal Infect**, v. 42, n. 8, p. 361-5, Aug 2012.
- 7 LEVINE, H. et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in adults may occur through saliva. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 3, p. 561-5, Mar 2012.
- 8 WHO. **Introduction of pneumococcal vaccine PCV13 Prevenar™**. DEPARTMENT OF IMMUNIZATION, V. A. B. I.: World Health Organization 2013.
- 9 OMS. **Treatment and prevention of pneumonia**, **Sixty-Third World Health Assembly**. Organização Mundial da Saúde, p.1-4. 2010
- 10 O'BRIEN, K. L. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, Sep 2009.
- 11 BOGAERT, D. et al. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2209-20, Jun 2004.
- 12 CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 7, p. 645-51, Jul 2004.
- 13 BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 3 Suppl, p.

- S67-74, Jul 2006.
- 14 CALIX, J. J. et al. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. **J Biol Chem**, v. 287, n. 33, p. 27885-94, Aug 2012.
- 15 WYRES, K. L. et al. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. **J Infect Dis**, v. 207, n. 3, p. 439-49, Feb 2013.
- 16 **Informe Regional SIREVA II 2012: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae y Neisseria meningitidis, en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2013. 2013.
- 17 NASCIMENTO-CARVALHO, C. N. et al. Invasive pneumococcal strains isolated from children and adolescents in Salvador. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 3, p. 209-14, 2003 May-Jun 2003.
- 18 ALVARES, J. R. et al. Prevalence of pneumococcal serotypes and resistance to antimicrobial agents in patients with meningitis: ten-year analysis. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 22-7, 2011 Jan-Feb 2011.
- 19 YOSHIOKA, C. R. et al. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 1, p. 70-5, 2011 Jan-Feb 2011.
- 20 BRANDILEONE, M. C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 5, p. 567-74, May 2006.
- 21 SCOTT, J. A. et al. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 973-81, Jun 1996.
- 22 KYAW, M. H. et al. Serotypes/groups distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal isolates: implications for vaccine strategies. **Epidemiol Infect**, v. 125, n. 3, p. 561-72, Dec 2000.
- 23 ROBINSON, K. A. et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. **JAMA**, v. 285, n. 13, p. 1729-35, Apr 2001.
- 24 HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D. R.; KLUGMAN, K. P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 83-93, Feb 2005.
- 25 Ministério da Saúde Informe Técnico da Vacina Pneumocócica 10-valente

- (conjugada), p.1-18. 2010
- 26 **Informe Regional SIREVA II 2012: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2013.: 358 p. 2013.
- 27 GRAY, B. M.; CONVERSE, G. M.; DILLON, H. C. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. **J Infect Dis**, v. 140, n. 6, p. 979-83, Dec 1979.
- 28 KO, A. I. et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 78-86, Jan 2000.
- 29 BEREZIN, E. N. et al. Pneumococcal meningitis in children: clinical findings, most frequent serotypes and outcome. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 1, p. 19-23, 2002 Jan-Feb 2002.
- 30 MANTESE, O. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 6, p. 537-42, 2003 Nov-Dec 2003.
- 31 CASTAÑEDA, E. et al. Distribution of capsular types and antimicrobial susceptibility of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Colombian children. Pneumococcal Study Group in Colombia. **Microb Drug Resist**, v. 3, n. 2, p. 147-52, 1997.
- 32 HORTAL, M. et al. Capsular type distribution and susceptibility to antibiotics of *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated from Uruguayan children with systemic infections. Pneumococcus Study Group. **Microb Drug Resist**, v. 3, n. 2, p. 159-63, 1997.
- 33 ROSSI, A. et al. Distribution of capsular types and penicillin-resistance of strains of *Streptococcus pneumoniae* causing systemic infections in Argentinian children under 5 years of age. *Streptococcus pneumoniae* Working Group. **Microb Drug Resist**, v. 3, n. 2, p. 135-40, 1997.
- 34 SESSEGOLO, J. F. et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 4, p. 906-11, Apr 1994.
- 35 LUCAREVSCHI, B. R. et al. Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 3, p. 215-20, 2003 May-Jun 2003.

- 36 LAVAL, C. B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 1, p. 50-5, Jan 2006.
- 37 BRUEGGEMANN, A. B. et al. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1424-32, May 2003.
- 38 _____. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. **J Infect Dis**, v. 190, n. 7, p. 1203-11, Oct 2004.
- 39 **Informe Regional de SIREVA II, 2009: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2010: 306 p. 2010.
- 40 **Informe Regional de SIREVA II, 2010: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2011: 315 p. 2011.
- 41 **Informe Regional de SIREVA II, 2011: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2012: 378 p. 2012.
- 42 BRANDILEONE, M. C. et al. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater São Paulo area, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 10, p. 2789-91, Oct 1995.
- 43 MANTESE, O. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 6, p. 495-502, 2009 Nov-Dec 2009.
- 44 KADIOGLU, A. et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008.
- 45 DALIA, A. B.; WEISER, J. N. Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 5, p. 486-96, Nov 2011.
- 46 RODRIGUEZ, J. L.; DALIA, A. B.; WEISER, J. N. Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3454-9, Oct

- 2012.
- 47 BENTLEY, S. D. et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLoS Genet**, v. 2, n. 3, p. e31, Mar 2006.
- 48 MARKS, L. R.; REDDINGER, R. M.; HAKANSSON, A. P. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. **MBio**, v. 3, n. 5, 2012.
- 49 JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J Biol Chem**, v. 276, n. 35, p. 33121-8, Aug 2001.
- 50 BAROCCHI, M. A.; CENSINI, S.; RAPPUOLI, R. Vaccines in the era of genomics: the pneumococcal challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 2963-73, Apr 2007.
- 51 SALHA, D. et al. Neutralizing antibodies elicited by a novel detoxified pneumolysin derivative, PlyD1, provide protection against both pneumococcal infection and lung injury. **Infect Immun**, v. 80, n. 6, p. 2212-20, Jun 2012.
- 52 MANCO, S. et al. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 4014-20, Jul 2006.
- 53 KING, S. J.; HIPPE, K. R.; WEISER, J. N. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 961-74, Feb 2006.
- 54 LONG, J. P.; TONG, H. H.; DEMARIA, T. F. Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. **Infect Immun**, v. 72, n. 7, p. 4309-13, Jul 2004.
- 55 TONG, H. H. et al. Immunization with recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase NanA protects chinchillas against nasopharyngeal colonization. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7775-8, Nov 2005.
- 56 MUKERJI, R. et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. **J Immunol**, v. 189, n. 11, p. 5327-35, Dec 2012.
- 57 REN, B. et al. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 10, p. 1574-82, Oct 2012.
- 58 FERREIRA, D. M. et al. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, v. 48, n. 6, p. 205-13, Jun 2010.

- 59 YUAN, Z. Q. et al. Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China. **Immunol Res**, v. 51, n. 1, p. 108-15, Oct 2011.
- 60 ELDHOLM, V. et al. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 7, p. 2223-34, Jul 2009.
- 61 MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 18, p. 3303-26, Sep 2013.
- 62 DARRIEUX, M. et al. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. **Crit Rev Microbiol**, Jul 2013.
- 63 BALACHANDRAN, P. et al. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 70, n. 5, p. 2526-34, May 2002.
- 64 OGUNNIYI, A. D. et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* elicited by immunization with pneumolysin and CbpA. **Infect Immun**, v. 69, n. 10, p. 5997-6003, Oct 2001.
- 65 MORRISON, K. E. et al. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 434-7, Jan 2000.
- 66 RAJAM, G. et al. Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review. **Crit Rev Microbiol**, v. 34, n. 3-4, p. 163-73, 2008.
- 67 TSENG, H. J. et al. Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. **Infect Immun**, v. 70, n. 3, p. 1635-9, Mar 2002.
- 68 SEO, J. Y. et al. Cross-protective immunity of mice induced by oral immunization with pneumococcal surface adhesin a encapsulated in microspheres. **Infect Immun**, v. 70, n. 3, p. 1143-9, Mar 2002.
- 69 PIMENTA, F. C. et al. Intranasal immunization with the cholera toxin B subunit-pneumococcal surface antigen A fusion protein induces protection against colonization with *Streptococcus pneumoniae* and has negligible impact on the nasopharyngeal and oral microbiota of mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 8, p. 4939-44, Aug 2006.
- 70 BROWN, J. S. et al. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6702-6, Nov 2001.
- 71 WHALAN, R. H. et al. Distribution and genetic diversity of the ABC transporter

- lipoproteins PiuA and PiaA within *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. **J Bacteriol**, v. 188, n. 3, p. 1031-8, Feb 2006.
- 72 JOMAA, M. et al. Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 24, n. 24, p. 5133-9, Jun 2006.
- 73 KWON, H. Y. et al. The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge. **Infect Immun**, v. 72, n. 10, p. 5646-53, Oct 2004.
- 74 CAO, J. et al. Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC, and ClpP. **Vaccine**, v. 25, n. 27, p. 4996-5005, Jun 2007.
- 75 GIEFING, C. et al. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 117-31, Jan 2008.
- 76 PRACT, D. et al. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. **Infect Immun**, v. 73, n. 5, p. 2680-9, May 2005.
- 77 JENSCH, I. et al. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 1, p. 22-43, Jul 2010.
- 78 BAROCCHI, M. A. et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 8, p. 2857-62, Feb 2006.
- 79 HARFOUCHE, C. et al. RrgB321, a fusion protein of the three variants of the pneumococcal pilus backbone RrgB, is protective in vivo and elicits opsonic antibodies. **Infect Immun**, v. 80, n. 1, p. 451-60, Jan 2012.
- 80 GLOVER, D. T.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2767-76, Jun 2008.
- 81 GREEN, B. A. et al. PppA, a surface-exposed protein of *Streptococcus pneumoniae*, elicits cross-reactive antibodies that reduce colonization in a murine intranasal immunization and challenge model. **Infect Immun**, v. 73, n. 2, p. 981-9, Feb 2005.
- 82 PATERSON, G. K.; MITCHELL, T. J. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 145-53, Jan 2006.
- 83 CRON, L. E. et al. Surface-associated lipoprotein PpmA of *Streptococcus*

- pneumoniae* is involved in colonization in a strain-specific manner. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 7, p. 2401-10, Jul 2009.
- 84 SHAH, P.; SWIATLO, E. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5888-92, Oct 2006.
- 85 SHAH, P. et al. Mucosal immunization with polyamine transport protein D (PotD) protects mice against nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 4, p. 403-9, Apr 2009.
- 86 VOLLMER, W.; TOMASZ, A. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 27, p. 20496-501, Jul 2000.
- 87 _____. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 7176-8, Dec 2002.
- 88 YAMAGUCHI, M. et al. PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 52, p. 36272-9, Dec 2008.
- 89 DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K. L. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 5, p. a012476, May 2013.
- 90 BRAIDO, F. et al. The role of Pneumococcal vaccine. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 21, n. 4, p. 608-15, Aug 2008.
- 91 SCHACHERN, P. A. et al. Virulence of pneumococcal proteins on the inner ear. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 135, n. 7, p. 657-61, Jul 2009.
- 92 SELVA, L. et al. Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years old, as identified by real-time PCR. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1487-95, Jul 2012.
- 93 BEREZIN, E. N. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 7, p. 643-5, Jul 2007.
- 94 RODGERS, G. L.; KLUGMAN, K. P. The future of pneumococcal disease prevention. **Vaccine**, v. 29 Suppl 3, p. C43-8, Sep 2011.
- 95 DAVIS, S. M. et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on nasopharyngeal carriage and invasive disease among unvaccinated people: Review of evidence on indirect effects. **Vaccine**, May 2013. ISSN 1873-2518.
- 96 LOBATO, F. **Bio-Manguinhos assina cooperação para introduzir a**

vacinapneumocócica no calendário nacional e desenvolver imunizantes contra dengue, febre amarela e malária. Rio de Janeiro: BioNotícias - Publicação Bimestral de Bio-Manguinhos/Fiocruz 2010.

- 97 CASTAÑEDA, E. et al. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 9, p. e265-70, Sep 2009.
- 98 COOPER, D. et al. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) elicits cross-functional opsonophagocytic killing responses in humans to *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 7A. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7207-11, Sep 2011.
- 99 SKINNER, J. M. et al. Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. **Vaccine**, v. 29, n. 48, p. 8870-6, Nov 2011.
- 100 SPRATT, B. G.; GREENWOOD, B. M. Prevention of pneumococcal disease by vaccination: does serotype replacement matter? **Lancet**, v. 356, n. 9237, p. 1210-1, Oct 2000.
- 101 PARRA, E. L. et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in invasive disease and nasopharyngeal carriage after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Bogotá, Colombia. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 4033-8, Aug 2013.
- 102 WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1962-73, Dec 2011.
- 103 DONATI, C.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1285, p. 115-32, May 2013.
- 104 FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, Jul 1995.
- 105 PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-20, Mar 2000.
- 106 OPREA, M.; ANTOHE, F. Reverse-vaccinology strategy for designing T-cell epitope candidates for *Staphylococcus aureus* endocarditis vaccine. **Biologicals**, v. 41, n. 3, p. 148-53, May 2013.
- 107 SIMIONATTO, S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. **Vet Microbiol**, v. 165, n. 3-4, p. 234-42, Aug 2013.
- 108 XIANG, Z.; HE, Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for human herpes

- simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology. **BMC Bioinformatics**, v. 14 Suppl 4, p. S2, 2013.
- 109 JOHN, L.; JOHN, G. J.; KHOLIA, T. A reverse vaccinology approach for the identification of potential vaccine candidates from *Leishmania* spp. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 167, n. 5, p. 1340-50, Jul 2012. I
- 110 TALUKDAR, S. et al. Identification of Potential Vaccine Candidates Against *Streptococcus pneumoniae* by Reverse Vaccinology Approach. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, n. 6, p. 3026-41, Mar 2014.
- 111 GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 244, n. 2, p. 305-13, Mar 2005.
- 112 MOFFITT, K. L. et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 2, p. 158-65, Feb 2011.
- 113 WIZEMANN, T. M. et al. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1593-8, Mar 2001.
- 114 ADAMOU, J. E. et al. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 949-58, Feb 2001.
- 115 CHOI, C. W. et al. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* secreted antigens by immuno-proteomic approach. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 72, n. 4, p. 318-27, Apr 2012.
- 116 MORSCZECK, C. et al. *Streptococcus pneumoniae*: proteomics of surface proteins for vaccine development. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 1, p. 74-81, Jan 2008.
- 117 DORMITZER, P. R.; ULMER, J. B.; RAPPUOLI, R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 12, p. 659-67, Dec 2008.
- 118 DORMITZER, P. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Structural vaccinology starts to deliver. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 12, p. 807-13, Dec 2012.
- 119 DEMAÏN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009 May-Jun 2009.
- 120 TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 2, p. 211-22, Sep 2006.
- 121 SALZBERG, S. L. et al. Microbial gene identification using interpolated Markov

- models. **Nucleic Acids Res**, v. 26, n. 2, p. 544-8, Jan 1998.
- 122 LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 5, p. 955-64, Mar 1997.
- 123 KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J Mol Biol**, v. 338, n. 5, p. 1027-36, May 2004.
- 124 NIELSEN, H. et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Eng**, v. 10, n. 1, p. 1-6, Jan 1997.
- 125 HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 14, n. 4, p. 378-9, 1998.
- 126 SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, v. 6, p. 175-82, 1998.
- 127 GARDY, J. L. et al. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 617-23, Mar 2005.
- 128 YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-15, Jul 2010.
- 129 BAGOS, P. G. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-positive bacteria with a Hidden Markov Model. **J Proteome Res**, v. 7, n. 12, p. 5082-93, Dec 2008.
- 130 J, S.; EF, F.; T, M. **Molecular Cloning – a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 131 INVITROGEN. **Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits: Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into vectors for high-level, inducible expression in *E. coli***. . Califórnia: 62 p. 2010.
- 132 DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 13, p. 6127-45, Jul 1988.
- 133 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.
- 134 GOR, D. O. et al. Relationship between surface accessibility for Ppma, PsaA, and

- PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p. 1304-12, Mar 2005.
- 135 SHAH, P. et al. Cellular location of polyamine transport protein PotD in *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 261, n. 2, p. 235-7, Aug 2006.
- 136 HARA-KAONGA, B.; PISTOLE, T. G. A dual fluorescence flow cytometric analysis of bacterial adherence to mammalian host cells. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 1, p. 37-43, Apr 2007.
- 137 EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004.
- 138 BALTZ, R. H. et al. DNA sequence sampling of the *Streptococcus pneumoniae* genome to identify novel targets for antibiotic development. **Microb Drug Resist**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 1998.
- 139 HOFFMAN, S. L. et al. From genomics to vaccines: malaria as a model system. **Nat Med**, v. 4, n. 12, p. 1351-3, Dec 1998.
- 140 NOWAK, R. Bacterial genome sequence bagged. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 468-70, Jul 1995.
- 141 RINAUDO, C. D. et al. Vaccinology in the genome era. **J Clin Invest**, v. 119, n. 9, p. 2515-25, Sep 2009.
- 142 SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530-41, Oct 2010.
- 143 SEIB, K. L.; DOUGAN, G.; RAPPUOLI, R. The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. **PLoS Genet**, v. 5, n. 10, p. e1000612, Oct 2009.
- 144 RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 445-50, Oct 2000.
- 145 BOEKHORST, J. et al. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. **J Bacteriol**, v. 187, n. 14, p. 4928-34, Jul 2005.
- 146 NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 1, p. 174-229, Mar 1999.
- 147 BEGHETTO, E. et al. Discovery of novel *Streptococcus pneumoniae* antigens by screening a whole-genome lambda-display library. **FEMS Microbiol Lett**, v. 262, n. 1, p. 14-21, Sep 2006.
- 148 ROCK, C. O. et al. The licC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a

- CTP:phosphocholine cytidyltransferase. **J Bacteriol**, v. 183, n. 16, p. 4927-31, Aug 2001. I
- 149 EBERHARDT, A. et al. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. **Microb Drug Resist**, v. 18, n. 3, p. 240-55, Jun 2012.
- 150 BROWN, J. S.; GILLILAND, S. M.; HOLDEN, D. W. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 572-85, May 2001.
- 151 JOMAA, M. et al. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6852-9, Oct 2005.
- 152 HÜBSCHER, J. et al. Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. **BMC Genomics**, v. 9, p. 617, 2008.
- 153 SONG, L. et al. A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains. **BMC Genomics**, v. 13, p. 128, 2012. I
- 154 WANG, C. et al. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. **PLoS Biol**, v. 11, n. 2, p. e1001493, 2013.
- 155 HAAS, W. et al. Revising the role of the pneumococcal vex-vncRS locus in vancomycin tolerance. **J Bacteriol**, v. 186, n. 24, p. 8463-71, Dec 2004.
- 156 LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radic Biol Med**, Jul 2013. ¹⁵⁷ HÄRTEL, T. et al. Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions. **Infect Immun**, v. 79, n. 1, p. 44-58, Jan 2011.
- 158 KAUSMALLY, L. et al. Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. **J Bacteriol**, v. 187, n. 13, p. 4338-45, Jul 2005.
- 159 WEI, H.; HÅVARSTEIN, L. S. Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 16, p. 5897-905, Aug 2012.
- 160 ATTALI, C. et al. *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. **Infect Immun**, v. 76, n. 2, p. 466-76, Feb 2008.
- 161 MORLOT, C. et al. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. **J Biol Chem**, v. 280, n. 16, p. 15984-91,

- Apr 2005.¹⁶² _____. The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 1641-8, Mar 2004.
- 163 VERA, A. et al. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. **Biotechnol Bioeng**, v. 96, n. 6, p. 1101-6, Apr 2007.
- 164 SCHNAITMAN, C. A. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. **J Bacteriol**, v. 108, n. 1, p. 545-52, Oct 1971. I
- 165 VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 17, p. 1385-95, Sep 2003.
- 166 LARENTIS, A. L. et al. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. **Protein Expr Purif**, v. 78, n. 1, p. 38-47, Jul 2011.
- 167 _____. Optimization of medium formulation and seed conditions for expression of mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) in *Escherichia coli* using a sequential experimental design strategy and response surface methodology. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 6, p. 897-908, Jun 2012.
- 168 RUSSELL, H. et al. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 10, p. 2191-5, Oct 1990.
- 169 ROMERO-STEINER, S. et al. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 2, p. 246-51, Mar 2003.
- 170 HOLMLUND, E. et al. Development of natural antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A and pneumolysin in Filipino pregnant women and their infants in relation to pneumococcal carriage. **Vaccine**, v. 24, n. 1, p. 57-65, Jan 2006.
- 171 BOGAERT, D. et al. Development of antibodies against the putative proteinase maturation protein A in relation to pneumococcal carriage and otitis media. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 166-8, Mar 2006.
- 172 SIMELL, B. et al. Serum antibodies to pneumococcal neuraminidase NanA in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 10, p. 1177-9, Oct 2006.
- 173 HOLMLUND, E. et al. Serum antibodies to the pneumococcal surface proteins PhtB

- and PhtE in Finnish infants and adults. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 5, p. 447-9, May 2007.
- 174 _____. Antibodies to pneumococcal proteins PhtD, CbpA, and LytC in Filipino pregnant women and their infants in relation to pneumococcal carriage. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 6, p. 916-23, Jun 2009.
- 175 OGUNNIYI, A. D.; GIAMMARINARO, P.; PATON, J. C. The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed in vivo. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 7, p. 2045-53, Jul 2002.
- 176 MAHDI, L. K. et al. Identification of a novel pneumococcal vaccine antigen preferentially expressed during meningitis in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 6, p. 2208-20, Jun 2012.
- 177 SANCHEZ, C. J. et al. *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28738, 2011.
- 178 _____. Changes in capsular serotype alter the surface exposure of pneumococcal adhesins and impact virulence. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26587, 2011.
- 179 KHAN, M. N. et al. PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. **Microbes Infect**, v. 14, n. 12, p. 1102-10, Oct 2012.
- 180 ROSENOW, C. et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 25, n. 5, p. 819-29, Sep 1997.
- 181 LIMOLI, D. H. et al. BgaA acts as an adhesin to mediate attachment of some pneumococcal strains to human epithelial cells. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 8, p. 2369-81, Aug 2011.
- 182 BERRY, A. M.; PATON, J. C. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5255-62, Dec 1996.
- 183 MCALLISTER, L. J. et al. Molecular analysis of the psa permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 889-901, Aug 2004.
- 184 BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 2, p. 295-303, Feb 2006.
- 185 KLINE, K. A. et al. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-92, Jun 2009.

- 186 PATERSON, G. K.; ORIHUELA, C. J. Pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules targeting of the extracellular matrix. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 1, p. 1-5, Jul 2010.
- 187 GOSINK, K. K. et al. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5690-5, Oct 2000.
- 188 FROLET, C. et al. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 190, 2010.
- 189 BERGMANN, S. et al. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1273-87, Jun 2001.
- 190 DAVE, S. et al. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3435-7, May 2001.
- 191 HAMMERSCHMIDT, S. et al. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 67, n. 4, p. 1683-7, Apr 1999.
- 192 JANULCZYK, R. et al. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **J Biol Chem**, v. 275, n. 47, p. 37257-63, Nov 2000.
- 193 CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2441-50, May 2007.
- 194 _____. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16879, 2011.
- 195 YANG, J.; JI, Y. Investigation of *Staphylococcus aureus* Adhesion and Invasion of Host Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1085, p. 187-94, 2014.
- 196 ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294
- 197 LIN, Y. P. et al. The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11301, 2010.
- 198 DENAPAITE, D. et al. The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9426, 2010.
- 199 REICHMANN, P. et al. Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. **J Bacteriol**, v. 193, n. 11, p. 2888-9, Jun 2011.

- 200 KEITH, E. R. et al. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 923-7, Mar 2006.
- 201 MOHAMMADI, J. S.; DHANASHREE, B. *Streptococcus pseudopneumoniae*: an emerging respiratory tract pathogen. **Indian J Med Res**, v. 136, n. 5, p. 877-80, Nov 2012.
- 202 PARK, H. K.; MYUNG, S. C.; KIM, W. Comparative transcriptomic analysis of streptococcus pseudopneumoniae with viridans group streptococci. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 77, 2012.
- 203 LIN, I. H. et al. Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20519, 2011.
- 204 MAJEWSKI, J. et al. Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. **J Bacteriol**, v. 182, n. 4, p. 1016-23, Feb 2000.
- 205 KILIAN, M. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2683, 2008.
- 206 MADHOUR, A.; MAURER, P.; HAKENBECK, R. Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. **Iran J Microbiol**, v. 3, n. 2, p. 58-67, Jun 2011.
- 207 JOHNSTON, C. et al. Detection of large numbers of pneumococcal virulence genes in streptococci of the mitis group. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 8, p. 2762-9, Aug 2010.
- 208 DONATI, C. et al. Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. **Genome Biol**, v. 11, n. 10, p. R107, 2010.

8. ANEXOS

Anexo 1 : Genomas utilizados, número de proteínas anotadas, estatus dos sequenciamentos, características das cepas, publicações e centros que realizaram o sequenciamento dos genomas utilizados para a montagem dos bancos de dados

TaxId ¹ ("GenBank")	Número de proteínas anotadas	Espécies e cepas	Estatus do sequenciamento (Abril/2009)	Características das amostras	Publicação	Centros de sequenciamento
não publicado	2.028	<i>S. pneumoniae</i> sorotipo 5 cepa 617/00	projeto WGS	sorotipo 5, isolado de líquido cefalorraquidiano, suscetível a penicilina	não publicado (este estudo)	VBI
516950	2.206	<i>S. pneumoniae</i> CGSP14	completo	sorotipo 14, isolado de paciente com pneumonia (Taiwan, 2004-2005)	BMC Genomics. (10:158)	BGI, China
512566	2.115	<i>S. pneumoniae</i> G54	completo	sorotipo 19F, MLST ST63, isolado do trato respiratório (Genova, Italia, 1997), resistente a macrolídeos e tetraciclina	Microb Drug Resist. (7(2):99-125)	J. Craig Venter Institute
488223	2.073	<i>S. pneumoniae</i> P1031	completo	1, MLST ST217	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
488222	2.123	<i>S. pneumoniae</i> JJA	completo	14	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
488221	2.202	<i>S. pneumoniae</i> 70585	completo	5	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
487214	2.155	<i>S. pneumoniae</i> Hungary19A-6	completo	sorotipo 19A (ATCC 700673), isolado de ouvido (Hungary, 1989) resistente a penicilina	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
487213	2.044	<i>S. pneumoniae</i> Taiwan19F-14	completo	serotipo 19F, isolado de líquido cefalorraquidiano (Taiwan, 1997), resistente a penicilina	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
373153	1.917	<i>S. pneumoniae</i> D39	completo	sorotipo 2, cepa virulenta encapsulado, MLST ST595	J Bacteriology (189, 38-51)	J. Craig Venter Institute
171101	2.043	<i>S. pneumoniae</i> R6	completo	sorotipo 2 (ATCC BAA-25), cepa avirulenta derivada da D39, MLST ST595	J Bacteriology (183, 5709-5717)	Eli Lilly
170187	2.105	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	completo	sorotipo 4 (ATCC BAA-34), cepa virulenta encapsulada, isolada do sangue de paciente mulher, 30 anos, em Kongsvinger Norway (Norway)	Science (293, 498-506)	454 Life Sciences and The Broad Institute and J. Craig Venter Institute
561276	1.990	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 700669	completo	sorotipo 23F, MLST ST81, cepa multidroga resistente (Barcelona, Spain, 1984)	J Bacteriology (191, 1480-9)	Sanger Institute
453366	1.851	<i>S. pneumoniae</i> MLV-016	projeto WGS	11 ^a	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
453365	2.088	<i>S. pneumoniae</i> CDC3059-06	projeto WGS	19 ^a	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
453364	1.825	<i>S. pneumoniae</i> CDC0288-04	projeto WGS	12F	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
453363	1.945	<i>S. pneumoniae</i> SP195	projeto WGS	sorotipo 9V (ATCC 700671), (Toulouse, France), resistente a trimethoprim-sulfamethoxazolere e a penicilina	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
453362	2.026	<i>S. pneumoniae</i> CDC1873-00	projeto WGS	6 ^a	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
453361	1.763	<i>S. pneumoniae</i> CDC1087-00	projeto WGS	7F	Genome Biology (11:R107)	J. Craig Venter Institute
406563	2.416	<i>S. pneumoniae</i> SP23-BS72	projeto WGS	sorotipo 23 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System

406562	2.480	<i>S. pneumoniae</i> SP19-BS75	projeto WGS	sorotipo 19 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406561	2.415	<i>S. pneumoniae</i> SP18-BS74	projeto WGS	sorotipo 18 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406560	2.807	<i>S. pneumoniae</i> SP14-BS69	projeto WGS	sorotipo 14 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406559	2.365	<i>S. pneumoniae</i> SP11-BS70	projeto WGS	sorotipo 11 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406558	2.429	<i>S. pneumoniae</i> SP9-BS68	projeto WGS	sorotipo 9 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406557	2.507	<i>S. pneumoniae</i> SP6-BS73	projeto WGS	sorotipo 6 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
406556	2.378	<i>S. pneumoniae</i> SP3-BS71	projeto WGS	sorotipo 3 isolado de nasofaringe de criança que adquiriu pneumonia após participar de um ensaio clínico com vacina pneumocócica no Hospital da Criança de Pittsburgh/EUA	BMC Genomics. (10:158)	West Penn Allegheny Health System
553482	2.001	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> 4047	completo		PLoS Pathogen (5, E1000346)	Sanger Institute
552526	1.893	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> MGCS10565	completo		PLoS ONE (3(8):e3026)	
471876	1.700	<i>S. pyogenes</i> NZ131	completo		J Bacteriology (190, 7773-85)	Washington University in St. Louis
471872	2.051	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ATCC BAA-102	projeto WGS		não publicado	Washington University in St. Louis
467705	2.051	<i>S. gordonii</i> str. Challis substr. CH1	completo		J Bacteriology (189(21))	J. Craig Venter Institute
391296	2.185	<i>S. suis</i> 98HAH33	completo		PLoS ONE (2, E315)	BGI, China
391295	2.186	<i>S. suis</i> 05ZYH33	completo		PLoS ONE (2, E315)	BGI, China
388919	2.270	<i>S. sanguinis</i> SK36	completo		J Bacteriology (189, 3166-3175)	Commonwealth Biotechnologies, Inc
370554	1.979	<i>S. pyogenes</i> MGAS10750	completo		PNAS (103, 7059-64)	Integrated Genomics Inc, Lab of Human Bacterial Pathogenesis, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, USA, Hamilton
370553	1.898	<i>S. pyogenes</i> MGAS2096	completo		PNAS (103, 7059-64)	Integrated Genomics Inc, Lab of Human Bacterial Pathogenesis, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, USA, Hamilton

370552	1.986	<i>S. pyogenes</i> MGAS10270	completo	PNAS (103, 7059-64)	Integrated Genomics Inc, Lab of Human Bacterial Pathogenesis, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, USA, Hamilton
370551	1.877	<i>S. pyogenes</i> MGAS9429	completo	PNAS (103, 7059-64)	Integrated Genomics Inc, Lab of Human Bacterial Pathogenesis, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, USA, Hamilton
342617	2.197	<i>S. agalactiae</i> CJB111	projeto WGS	não publicado	J. Craig Venter Institute
342616	2.376	<i>S. agalactiae</i> COH1	projeto WGS	não publicado	J. Craig Venter Institute
342615	2.376	<i>S. agalactiae</i> H36B	projeto WGS	não publicado	J. Craig Venter Institute
342614	2.275	<i>S. agalactiae</i> 515	projeto WGS	não publicado	J. Craig Venter Institute
342613	2.146	<i>S. agalactiae</i> 18RS21	projeto WGS	não publicado	J. Craig Venter Institute
322159	1.716	<i>S. thermophilus</i> LMD-9	completo	PNAS (103, 15611-6)	DOE Joint Genome Institute, Fidelity Systems Inc
319701	1.894	<i>S. pyogenes</i> MGAS6180	completo	J Infect Dis (192, 760-770)	Integrated Genomics Inc
299768	1.915	<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066	completo	Nature Biotechnology (22, 1554-8)	Integrated Genomics Inc
293653	1.865	<i>S. pyogenes</i> MGAS5005	completo	J Infect Dis (192, 771-82)	Integrated Genomics Inc
286636	1.886	<i>S. pyogenes</i> MGAS10394	completo	J Infect Dis (190, 727-738)	
286604	2.119	<i>S. suis</i> 89/1591	projeto WGS	não publicado	DOE Joint Genome Institute
264199	1.889	<i>S. thermophilus</i> LMG 18311	completo	Nature Biotechnology (22, 1554-8)	Integrated Genomics Inc
218495	1.762	<i>S. uberis</i> 0140J	completo	BMC Genomics (10, :54)	Sanger Institute
211110	2.094	<i>S. agalactiae</i> NEM316	completo	mol Microbiology (45, 1499-513)	Institut Pasteur
210007	1.960	<i>S. mutans</i> UA159	completo	PNAS (99,14434-14439)	
208435	2.124	<i>S. agalactiae</i> 2603V/R	completo	PNAS (99, 12391-12396)	J. Craig Venter Institute
205921	1.996	<i>S. agalactiae</i> A909	completo	PNAS (102, 13950-5)	J. Craig Venter Institute
198466	1.865	<i>S. pyogenes</i> MGAS315	completo	PNAS (99, 10078-10083)	
193567	1.861	<i>S. pyogenes</i> SSI-1	completo	Genome Research (13, 1042-55)	
186103	1.839	<i>S. pyogenes</i> MGAS8232	completo	PNAS (99, 4668-4673)	
160491	1.745	<i>S. pyogenes</i> str. Manfredo	completo	J Bacteriology (189, 1473-1477)	Sanger Institute
160490	1.697	<i>S. pyogenes</i> M1 GAS	completo	PNAS (98,4658-4663)	

¹TaxID – número de identificação taxonômica da espécie no banco de dados “GenBank”

Anexo 2: Meios de cultura

Meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) ¹³⁰

COMPONENTES	LB LÍQUIDO	LB SÓLIDO
	QUANTIDADE	
1. Extrato de levedura	5 g/L	5 g/L
2. Cloreto de sódio	10 g/L	10 g/L
3. Triptona	10 g/L	10 g/L
4. Ágar bacteriológico	-	17 g/L

O meio foi autoclavado por 20 min a 121°C e estocado a temperatura ambiente até o momento do uso.

Meio Terrific Broth (TB) (Sambrook *et al.*, 1989) ¹³⁰

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO E QUANTIDADE
1. Fosfato de potássio monobásico	170 mM
2. Fosfato de potássio dibásico	720 mM
3. Glicerol	4,0 mL
4. Triptona	12 g
5. Extrato de levedura	24 g
6. Água Milli-Q q.s.p.	900 mL

O meio contendo glicerol, triptona e extrato de levedura foi preparado, autoclavado por 20 min a 121°C. Após esfriar foi adicionado ao meio 100 mL de solução estéril contendo os sais.

Meios TSA, THB, MEM

Os meios TSA (Becton & Dickinson), THB (Becton & Dickinson), MEM (Life Technologies) foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes, sendo os meios THB e MEM filtrados e o meio TSA autoclavado por 20 min a 121°C.

Anexo 3: Soluções

Soluções para eletroforese em gel de agarose

Tampão tris base/ácido acético glacial/EDTA (TAE) 50X (Sambrook *et al.*, 1989) ¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Tris base	242 g
2. Ácido acético glacial	57,1 mL
3. EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL
4. Água Milli-Q (q.s.p.)	1000 mL

A solução foi autoclavada por 20 min a 121°C e estocada a temperatura ambiente, sendo a solução de uso diluída, em água Milli-Q, para a concentração de 1X.

Tampão de Amostra 6X para ácido desoxirribonucléico (ADN) (Sambrook *et al.*, 1989) ¹³⁰

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Azul de Bromofenol	0,25%
2. Glicerol	40%
3. Água Milli-Q q.s.p.	10 mL

A solução foi estocada a -20°C sendo diluída no momento do uso.

Soluções para lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) ¹³⁰

Solução I

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Glicose	50 mM
2. Tris-HCl pH 8	25 mM
3. Ácido etilenodiamino tetra-acético	10 mM

A solução foi esterelizada por filtração utilizando-se filtro de 022 µm (Millipore) e estocada a 4°C.

Solução II

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Hidróxido de sódio	0,2 M
2. Dodecil sulfato de sódio	1%

A solução II foi preparada no momento do uso.

Solução III

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Acetato de potássio	3 M
2. Ácido acético	11,5%

Tampão de lise para análise da solubilidade das proteínas recombinantes

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Tris	20 mM pH 8
2. EDTA	1 mM pH 8

Foram testados os tampões lise sem triton X-100 e com triton X-100. Neste caso foi adicionado 0,1% do detergente ao tampão.

Soluções para SDS-PAGE

Tampão de Amostra 4X para proteína

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Tris pH 6,8	0,5 M
2. Dodecil sulfato de sódio (SDS)	8%
3 Glicerol	40%
4. Beta-mercaptaetanol	16%
5. Azul de bromofenol	0,06%
6. Água Milli-Q q.s.p.	10 mL

A solução foi estocada a 4°C sendo a concentração final de uso diluída para 1X.

Acrilamida 30% (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

Foi preparada uma solução contendo 29 g de acrilamida e 1 g de “NN’-methylenebisacrilamida” (bis-acrilamida). Esta foi homogeneizada, sob aquecimento de 37°C, em 60 mL de água Milli-Q. A seguir o volume foi ajustado para 100 mL e a solução filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore), sendo estocada a 4°C em frasco de vidro protegido da luz.

Persulfato de amônio 10% (APS 10%) (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

A massa de 1g de APS foi dissolvido em 10 mL de água milli-Q. As alíquotas foram armazenadas a -20°C e descongeladas no momento do uso.

Solução para o gel de separação (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Acrilamida 30%	4,5 mL
2. Tris 1,5 M pH 8,8	2,3 mL
3. Dodecil sulfato de sódio 10%	90 µL
4. Persulfato de amônio 10%	50 µL
5. TEMED (tetra-metil-etilenodiamina)	6,6 µL
6. Água Milli-Q q.s.p.	3,1 mL

As quantidades acima descritas foram utilizadas para o preparo de dois géis de 1 mm a 13,5%.

Solução para o gel de empilhamento (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Acrilamida 30%	880 µL
2. Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,66 mL
3. SDS 10%	66 µL
4. APS 10%	40 µL
5. TEMED	12,0 µL
6. Água Milli-Q q.s.p.	4,0 mL

As quantidades acima descritas foram utilizadas para o preparo de dois géis de 1 mm a 4%.

Tampão de corrida 10X (tampão tris base/glicina/SDS) (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Tris base	30 g
2. Glicina	144 g
3. SDS	12 g
4. Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente, sendo a solução de uso diluída, em água Milli-Q, para 1X.

Tampão de transferência 10X (tampão tris base/glicina) (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Tris base	30 g
2. Glicina	144 g
3. Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL

A solução foi estocada a 4°C, sendo a solução de uso diluída, em água Milli-Q, para 1X.

Soluções para coloração rápida de gel de poliacrilamida

Solução A

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Metanol	50%
2. Ácido acético glacial	10%

Solução B

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Etanol	5%
2. Ácido acético glacial	7,5%

A cada 50 mL de solução B foi acrescido 1 mL de solução de comassie blue R 0,25% em etanol 95%.

Solução descorante

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Metanol	5%
2. Ácido acético glacial	7%

Solução tampão fosfatada (PBS 10X) (Sambrook *et al.*, 1989)¹³⁰

COMPONENTES	QUANTIDADE
1. Cloreto de Sódio	80 g
2. Cloreto de Potássio	2 g
3. Fosfato de Sódio	14,4 g
4. Fosfato de Potássio dibásico	2,4 g
5. Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada a 121°C por 15 min e estocada a 4°C, sendo a solução de uso diluída, em água Milli-Q, para 1X.

Soluções de lavagens e bloqueadoras

As soluções de lavagem dos “immunoblotting” e ELISA foi PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST).

A solução bloqueadora dos “immunoblotting” foi PBST acrescido de 4% de leite desnatado.

A solução de diluição dos anticorpos nos “immunoblotting” foi PBST acrescido de 0,25% de albumina bovina fração V (BSA) (Sigma- Aldrich St Louis, EUA) (PBSTB).

A solução bloqueadora da citometria de fluxo, IFI e ELISA foi PBS acrescida de 3% de BSA (PBSB).

Soluções para ELISA

Tampão de sensibilização

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
1. Carbonato de sódio	15 mM
2. Bicarbonato de sódio pH 9,6	35 mM

A solução foi mantida a 4°C.

Anexo 4: Características e fonte/referência das espécies de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho

CEPA	CARACTERÍSTICAS	FONTE/REFERÊNCIA
<i>E. coli</i> TOP10	F <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Life Technologies e Sambrook <i>et al.</i> , 1989 ¹³⁰
<i>E. coli</i> BL2 Star (DE3)	F <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> <i>rne</i> 131(DE3)	Life Technologies e Sambrook <i>et al.</i> , 1989 ¹³⁰

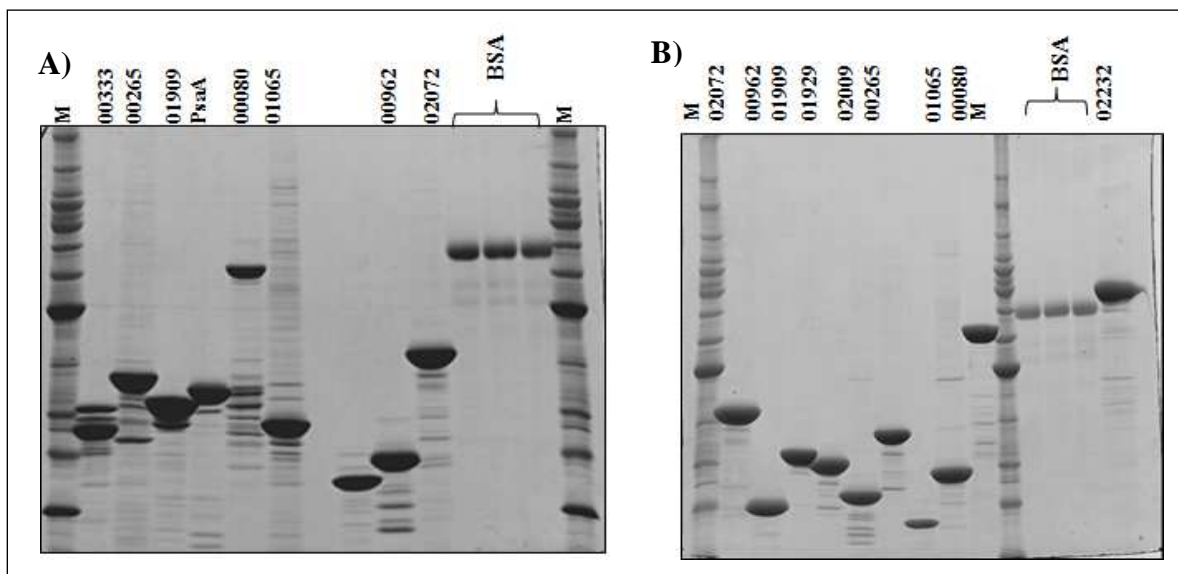
Anexo 5: Amostras de pneumococos

Número da cepa	Ano de isolamento	Idade do paciente	Sorotipo	MLST ¹	TMP/SM X ²	Clindamicina	Cloranfenicol	Penicillina	Eritromicina	Tetraciclina	Sítio de isolamento	Gentilmente cedido por	Origem
352261*	2005	01 ^a	5	ST 289	S ³	S	S	S	S	S	sangue	CPqGM ⁷	Salvador, Brasil
700*	2007	21 ^a	35B	NA ⁶	R ⁴	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
703*	2007	12 ^a	8	NA	S	S	S	S	S	I ⁵	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
704*	2007	11 ^a	20	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
706*	2007	41 ^a	10 ^a	NA	S	S	S	S	S	I	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
715*	2007	26 ^a	9N	NA	I	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
717*	2007	05 ^a	18B	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
720*	2007	05 ^a	19F	SLV 651	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
722*	2007	01a04m	14	NA	R	S	S	S	S	R	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
724*	2007	12 ^a	9V	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
727	2007	33 ^a	9N	NA	S	S	S	S	S	I	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
728*	2007	01a10m	19 ^a	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
729*	2007	23 ^a	4	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
733	2007	15 ^a	18C	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
734*	2008	26 ^a	12F	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
745*	2008	22 ^a	6C	NA	I	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
746	2008	24 ^a	6B	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
749*	2008	48 ^a	3	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
753	2008	09 ^a	19 ^a	SLV 2878	I	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
756*	2008	40 ^a	23F	NA	R	S	S	R	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
777*	2008	60 ^a	17F	NA	S	S	S	S	S	I	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
782	2009	23 ^a	12F	8376	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
785	2009	14 ^a	35B	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
786*	2009	27 ^a	34	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
788*	2009	71 ^a	23 ^a	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
791	2009	19 ^a	NT ⁸	NA	R	S	R	R	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
793*	2009	0a11m	6B	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
800*	2009	46 ^a	7F	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
807	2009	27 ^a	20	NA	S	S	S	S	S	I	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
819*	2010	22 ^a	7C	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
827*	2010	12 ^a	16F	NA	R	S	S	S	S	R	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
841*	2010	19 ^a	11 ^a	NA	I	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
843*	2010	65 ^a	23B	NA	R	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
845*	2010	02 ^a	18C	NA	S	S	S	S	S	S	meningite	CPqGM	Salvador, Brasil
St 525/00*	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	Fluído pleural	IAL ⁹	São Paulo, Brasil
St 126/98	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	Líquido cefalorraquidiano	IAL	São Paulo, Brasil

St 617/00 (this study)	NA	NA	5	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	Líquido cefalorraquidiano	IAL	São Paulo, Brasil
St 113/95	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	sangue	IAL	São Paulo, Brasil
1871	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
2721	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
5287	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
361 (ATCC 6314)	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	INCQS ¹⁰ /FIOCRUZ	Rio de Janeiro, Brasil
2720	NA	NA	19 ^a	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
1700	NA	NA	19 ^a	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
St 372/00	NA	NA	19F	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	sangue	IAL	São Paulo, Brasil
St 360/00	NA	NA	23F	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	Líquido cefalorraquidiano	IAL	São Paulo, Brasil
5552	NA	NA	23F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Centro Nacional de <i>Streptococcus</i> /Universidade de Alberta	Canada
ATCC 10341*	NA	NA	41	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	INCQS/Fiocruz	Rio de Janeiro, Brasil
ATCC 10361*	NA	NA	61	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	INCQS/Fiocruz	Rio de Janeiro, Brasil
ATCC 6303	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	INCQS/Fiocruz	Rio de Janeiro, Brasil
ATCC 49619	NA	NA	19F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	INCQS/Fiocruz	Rio de Janeiro, Brasil

*amostras de pneumococos para as quais os genes amplificados foram sequenciados e avaliados quanto a identidade nucleotídica e proteica; ¹MLST – “multilocus sequence typing”; ²TMX/SMP - trimetoprim/sulfametoxazol; ³S – sensível; ⁴R – resistente; ⁵I – intermediário; ⁶NA – não se aplica; ⁷CPqGM - Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)/Bahia/Salvador/Brasil; ⁸NT - não tipável; ⁹IAL - Instituto Adolfo Lutz/São Paulo/SP/Brasil; ¹⁰INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz/Rio de Janeiro/RJ/Brasil. Na idade do paciente, ‘a’ é para ‘ano’ e ‘m’ para ‘mês’.

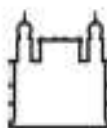
Anexo 6: Gel de SDS-PAGE utilizado para realização da densitometria (verificar pureza proteica)



Um total de 30 μg de cada uma das proteínas recombinantes e 5 μg de BSA foram aplicadas em gel de SDS-PAGE (gradiente de 8 a 17%). A separação eletroforética foi realizada com amperagem constante de 20 mA durante 16 h. Os géis foram corados com azul de comassie-R utilizando a coloração rápida. Após descorados os géis foram escaneados no “GS-800 calibrated densitometer” (Bio-Rad) e as análises realizadas com o programa “Quantity one 4.6.8” (Bio-Rad). As proteínas acima representadas apresentaram purezas de:

Gel A		Gel B	
Proteína	Pureza	Proteína	Pureza
00333	58%	02072	85%
00265	69%	00962	97%
01909	77%	01909	97%
PsaA	87%	01929	81%
00080	51%	02009	77%
01065	71%	00265	91%
00962	85%	01065	80%
02072	90%	00080	86%
		02232	80%

Anexo 7: Licença CEUA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-2/11

Certificamos que o protocolo (P-7/10-4), intitulado "Desenvolvimento de uma vacina brasileira contra *S. pneumoniae*.", sob a responsabilidade de DENISE DA SILVA GOMES PEREIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2014 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 575 Machos de Swiss Webster, Peso: 35,0000 Grama(s).
- 575 Fêmeas de Swiss Webster, Peso: 35,0000 Grama(s).

Oryctolagus cuniculus

- 88 Machos de Nova Zelândia, Peso: 2,0000 Kilo(s).
- 89 Fêmeas de Nova Zelândia, Peso: 2,0000 Kilo(s).

Mus musculus

- 590 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 6 Semana(s), Peso: 30,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 270 Machos de Swiss Webster, Peso: 16,0000 Grama(s).
- 270 Fêmeas de Swiss Webster, Peso: 16,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio de Expansão - sala 200 - Marquês - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3862.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Anexo 8: Proteínas ortólogas encontradas em pneumococos

ORF em SPN 5 617/00	Número de genomas de <i>S. pneumoniae</i>	Número de genomas de <i>Streptococcus</i> sp.	Número de genomas totais	Descrição proteína
orf00002	26	0	26	>orf00002 orf00002 hypothetical protein CGSSp3BS71_07921 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 5302:5538 forward MW:9686
orf00026	26	0	26	>orf00026 orf00026 phosphopantothenoylcysteine decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 23432:23995 reverse MW:22554
orf00062	26	0	26	>orf00062 orf00062 Homologous to LicC, which regulates expression of LPS epitopes in H. influenzae [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 54366:55055 reverse MW:26875
orf00063	26	0	26	>orf00063 orf00063 protein LicB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 55067:55945 reverse MW:31600
orf00064	26	0	26	>orf00064 orf00064 choline kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 55935:56804 reverse MW:33430
orf00065	26	0	26	>orf00065 orf00065 alcohol dehydrogenase, zinc-containing [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 56821:57843 reverse MW:38800
orf00067	26	0	26	>orf00067 orf00067 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 57848:58555 reverse MW:26256
orf00068	26	0	26	>orf00068 orf00068 polysaccharide biosynthesis protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 58891:60378 forward MW:56559
orf00080	26	0	26	>orf00080 orf00080 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39] 70465:72024 forward MW:59567
orf00083	26	0	26	>orf00083 orf00083 hypothetical protein SP_1925 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 72833:73441 forward MW:23319
orf00085	26	0	26	>orf00085 orf00085 pneumolysin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 73855:75270 forward MW:52898
orf00090	26	0	26	>orf00090 orf00090 hypothetical protein SP_1917 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 79404:79766 forward MW:13844
orf00095	26	0	26	>orf00095 orf00095 hypothetical protein SP_1912 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 82142:82441 forward MW:11211
orf00133	26	0	26	>orf00133 orf00133 BlpS protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 110068:110406 reverse MW:13462
orf00134	26	0	26	>orf00134 orf00134 BlpT protein, fusion [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 110682:111011 forward MW:12493
orf00138	26	0	26	>orf00138 orf00138 hypothetical protein SP_0520 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 113444:113731 forward MW:10888
orf00185	26	0	26	>orf00185 orf00185 hypothetical protein SpneCDC_05065 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 160350:161528 reverse MW:46443
orf00196	26	0	26	>orf00196 orf00196 type II DNA modification methyltransferase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 177257:178447 reverse MW:45782
orf00205	26	0	26	>orf00205 orf00205 hypothetical protein spr1278 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 184753:185241 forward MW:19237
orf00209	26	0	26	>orf00209 orf00209 acetyltransferase, GNAT family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 187988:188539 forward MW:20812
orf00217	26	0	26	>orf00217 orf00217 prolipoprotein diacylglycerol transferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 195506:195895 forward MW:14290
orf00265	26	0	26	>orf00265 orf00265 psr protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 234312:235586 forward MW:47732
orf00270	26	0	26	>orf00270 orf00270 hypothetical protein spr1222 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 238807:240240 forward MW:54801
orf00271	26	0	26	>orf00271 orf00271 hypothetical protein spr1221 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 240269:241303 forward MW:38691
orf00315	26	0	26	>orf00315 orf00315 ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 275376:275987 reverse MW:22800
orf00333	26	0	26	>orf00333 orf00333 ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 285799:287787 reverse MW:74702
orf00397	26	0	26	>orf00397 orf00397 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 341432:342673 forward MW:45168
orf00415	26	0	26	>orf00415 orf00415 C3-degrading proteinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 355368:356093 forward MW:27537
orf00427	26	0	26	>orf00427 orf00427 DnaQ family exonuclease/DinG family helicase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 367856:370306 reverse MW:93558
orf00429	26	0	26	>orf00429 orf00429 hypothetical protein SP_0800 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 371574:371861 forward MW:10984
orf00528	26	0	26	>orf00528 orf00528 ylmG protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 450757:451020 forward MW:9764

orf00529	26	0	26	>orf00529 orf00529 hypothetical protein spr1506 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 451017:451802 forward MW:30431
orf00540	26	0	26	>orf00540 orf00540 efflux ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 461172:463880 forward MW:100373
orf00558	26	0	26	>orf00558 orf00558 hypothetical protein SP_1459 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 478299:478523 reverse MW:8286
orf00566	26	0	26	>orf00566 orf00566 hypothetical protein SP_1467 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 482922:483503 reverse MW:21094
orf00579	26	0	26	>orf00579 orf00579 peptidoglycan GlcNAc deacetylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 495042:496484 reverse MW:54635
orf00580	26	0	26	>orf00580 orf00580 glycyl-tRNA synthetase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 496668:497045 reverse MW:14448
orf00587	26	0	26	>orf00587 orf00587 hydrolase, haloacid dehalogenase-like family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 501856:502488 forward MW:23547
orf00589	26	0	26	>orf00589 orf00589 capsular polysaccharide biosynthesis protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 502792:504642 reverse MW:69218
orf00599	26	0	26	>orf00599 orf00599 hypothetical protein SpnC_00140 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 516262:516651 forward MW:14931
orf00619	26	0	26	>orf00619 orf00619 Positive transcriptional regulator of mutA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 535135:535998 reverse MW:33973
orf00641	26	0	26	>orf00641 orf00641 pneumococcal surface protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 553873:554115 reverse MW:8887
orf00645	26	0	26	>orf00645 orf00645 methionyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 558253:559452 reverse MW:41823
orf00723	26	0	26	>orf00723 orf00723 transcriptional regulator, GntR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 620204:620932 reverse MW:27992
orf00724	26	0	26	>orf00724 orf00724 Beta-glucosidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 621090:622499 forward MW:55097
orf00726	26	0	26	>orf00726 orf00726 PTS system, IIC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 622517:623812 forward MW:46637
orf00727	26	0	26	>orf00727 orf00727 hypothetical protein SpneT_02000121 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 623817:624125 forward MW:11304
orf00743	26	0	26	>orf00743 orf00743 hypothetical protein CGSSp3BS71_05024 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 639522:640145 reverse MW:24386
orf00787	26	0	26	>orf00787 orf00787 competence protein CelB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 667806:669995 forward MW:82522
orf00790	26	0	26	>orf00790 orf00790 hypothetical protein SpneCDC1_02325 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 670986:672170 forward MW:44962
orf00813	26	0	26	>orf00813 orf00813 foldase protein PrsA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 688821:689774 forward MW:38279
orf00863	26	0	26	>orf00863 orf00863 addiction module antitoxin, RelB/DinJ family protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 743580:743843 forward MW:10057
orf00879	26	0	26	>orf00879 orf00879 hypothetical protein CGSSp9BS68_08907 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 755208:755915 forward MW:25801
orf00881	26	0	26	>orf00881 orf00881 alcohol dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 756991:758313 forward MW:48948
orf00885	26	0	26	>orf00885 orf00885 hypothetical protein SpneT_02001811 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 759748:760065 reverse MW:12397
orf00944	26	0	26	>orf00944 orf00944 hypothetical protein SP_1600 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 807194:808345 reverse MW:41697
orf00962	26	0	26	>orf00962 orf00962 thioredoxin family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 818836:819402 reverse MW:20858
orf00967	26	0	26	>orf00967 orf00967 hypothetical protein SP_0653 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 823448:823588 reverse MW:5581
orf00986	26	0	26	>orf00986 orf00986 glycosyl transferase, family 2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 843355:843543 forward MW:7172
orf01029	26	0	26	>orf01029 orf01029 hypothetical protein SP_0031 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 882486:882800 forward MW:12058
orf01049	26	0	26	>orf01049 orf01049 hypothetical protein CGSSp14BS69_08820 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 900842:901906 reverse MW:40318
orf01050	26	0	26	>orf01050 orf01050 hypothetical protein SpneCDC_08279 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 901969:902880 reverse MW:34265
orf01051	26	0	26	>orf01051 orf01051 hypothetical protein SpneCD_10204 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 902873:903466 reverse MW:21447
orf01064	26	0	26	>orf01064 orf01064 hypothetical protein CGSSp3BS71_11463 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 911702:912439 forward MW:27521
orf01065	26	0	26	>orf01065 orf01065 sensor histidine kinase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 912439:913536 forward MW:42104
orf01090	26	0	26	>orf01090 orf01090 hypothetical protein spr1796 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 930833:931495 forward MW:25140
orf01127	26	0	26	>orf01127 orf01127 hypothetical protein SP_1945 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 961146:961766 forward MW:23553
orf01133	26	0	26	>orf01133 orf01133 hypothetical protein CGSSp14BS69_13233 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 966697:968067 forward MW:49783

<u>orf01135</u>	26	0	26	>orf01135 orf01135 autolysin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 968626:969399 forward MW:29649
<u>orf01159</u>	26	0	26	>orf01159 orf01159 hypothetical protein CGSSp14BS69_00480 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 986937:987251 forward MW:12408
<u>orf01161</u>	26	0	26	>orf01161 orf01161 hypothetical protein SpneT_02001880 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 987467:987664 forward MW:7678
<u>orf01163</u>	26	0	26	>orf01163 orf01163 hypothetical protein spr1926 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 988413:989054 forward MW:24154
<u>orf01164</u>	26	0	26	>orf01164 orf01164 hypothetical protein SP_2115 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 989072:989302 forward MW:8396
<u>orf01170</u>	26	0	26	>orf01170 orf01170 MesJ/Ycf62 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 992234:993193 reverse MW:37355
<u>orf01171</u>	26	0	26	>orf01171 orf01171 MesJ/Ycf62 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 993190:993510 reverse MW:12559
<u>orf01188</u>	26	0	26	>orf01188 orf01188 putative sensor histidine kinase ComD [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1007529:1008470 forward MW:36200
<u>orf01195</u>	26	0	26	>orf01195 orf01195 ABC transporter, permease protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1011816:1014368 reverse MW:97187
<u>orf01201</u>	26	0	26	>orf01201 orf01201 hypothetical protein CGSSp18BS74_00160 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1020590:1021840 forward MW:48021
<u>orf01203</u>	26	0	26	>orf01203 orf01203 hypothetical protein SpneT_02000236 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1023162:1023983 forward MW:30231
<u>orf01208</u>	26	0	26	>orf01208 orf01208 rod shape-determining protein MreC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1027033:1027851 forward MW:29739
<u>orf01209</u>	26	0	26	>orf01209 orf01209 rod shpae-determining protein MreD, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1027851:1028345 forward MW:19324
<u>orf01225</u>	26	0	26	>orf01225 orf01225 hypothetical protein CGSSp3BS71_06714 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1044318:1044866 forward MW:20309
<u>orf01230</u>	26	0	26	>orf01230 orf01230 ribonuclease HIII [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1049846:1050745 forward MW:33285
<u>orf01307</u>	26	0	26	>orf01307 orf01307 choline binding protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1105231:1105401 forward MW:6216
<u>orf01364</u>	26	0	26	>orf01364 orf01364 23S rRNA m1G745 methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1167028:1167876 reverse MW:31998
<u>orf01370</u>	26	0	26	>orf01370 orf01370 type I restriction-modification system, M subunit, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1174324:1175817 forward MW:56677
<u>orf01454</u>	26	0	26	>orf01454 orf01454 ornithine carbamoyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1243861:1243986 forward MW:4593
<u>orf01473</u>	26	0	26	>orf01473 orf01473 ribosomal protein L11 methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1255576:1256805 forward MW:45297
<u>orf01529</u>	26	0	26	>orf01529 orf01529 hypothetical protein CGSSp6BS73_09384 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1296612:1297064 reverse MW:17623
<u>orf01556</u>	26	0	26	>orf01556 orf01556 thiamine-phosphate pyrophosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1325275:1325907 reverse MW:22744
<u>orf01557</u>	26	0	26	>orf01557 orf01557 hydroxyethylthiazole kinase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1325900:1326703 reverse MW:28981
<u>orf01558</u>	26	0	26	>orf01558 orf01558 hypothetical protein SP_0723 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1326703:1327227 reverse MW:19195
<u>orf01560</u>	26	0	26	>orf01560 orf01560 hypothetical protein spr0633 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1327935:1328585 reverse MW:24976
<u>orf01562</u>	26	0	26	>orf01562 orf01562 hypothetical protein CGSSp3BS71_08791 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1329973:1330533 reverse MW:20309
<u>orf01563</u>	26	0	26	>orf01563 orf01563 thiamine-phosphate pyrophosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 1331093:1331722 reverse MW:23261
<u>orf01575</u>	26	0	26	>orf01575 orf01575 hypothetical protein spr0618 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1341467:1342171 reverse MW:28098
<u>orf01577</u>	26	0	26	>orf01577 orf01577 hypothetical protein SpneC_01195 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 1342927:1343691 reverse MW:28216
<u>orf01587</u>	26	0	26	>orf01587 orf01587 hypothetical protein SP_0682 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1353092:1353346 reverse MW:9454
<u>orf01610</u>	26	0	26	>orf01610 orf01610 sensor histidine kinase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1374781:1376472 reverse MW:63638
<u>orf01632</u>	26	0	26	>orf01632 orf01632 hypothetical protein spr0927 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1395773:1396204 forward MW:16016
<u>orf01644</u>	26	0	26	>orf01644 orf01644 iron-compound ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1406249:1407043 forward MW:29662
<u>orf01652</u>	26	0	26	>orf01652 orf01652 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1413053:1413964 forward MW:33718
<u>orf01655</u>	26	0	26	>orf01655 orf01655 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1416102:1416641 forward MW:20623
<u>orf01656</u>	26	0	26	>orf01656 orf01656 hypothetical protein spr1904 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1416625:1417302 forward MW:25063
<u>orf01658</u>	26	0	26	>orf01658 orf01658 hypothetical protein SpneCD_10519 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1418374:1419651 forward MW:49045

orf01672	26	0	26	>orf01672 orf01672 hypothetical protein SpneCDC1_08138 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 1428593:1430410 forward MW:67273
orf01679	26	0	26	>orf01679 orf01679 competence protein CglID [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1435768:1436154 forward MW:13973
orf01687	26	0	26	>orf01687 orf01687 potassium uptake protein, Trk family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1439260:1439484 reverse MW:8328
orf01726	26	0	26	>orf01726 orf01726 fatty acid/phospholipid synthesis protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1472672:1474021 reverse MW:49583
orf01758	26	0	26	>orf01758 orf01758 hypothetical protein SP_1786 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1495263:1495715 reverse MW:16629
orf01775	26	0	26	>orf01775 orf01775 acetyltransferase, GNAT family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1508578:1509024 reverse MW:17202
orf01777	26	0	26	>orf01777 orf01777 Type 4 prepilin peptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1509094:1509753 forward MW:24762
orf01816	26	0	26	>orf01816 orf01816 hypothetical protein SP_1712 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1534585:1535754 forward MW:44645
orf01837	26	0	26	>orf01837 orf01837 hypothetical protein CGSSp9BS68_04155 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1557841:1558329 forward MW:18321
orf01862	26	0	26	>orf01862 orf01862 hypothetical protein CGSSp6BS73_08579 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1581002:1581619 forward MW:23772
orf01891	26	0	26	>orf01891 orf01891 hypothetical protein spr0510 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1608770:1609771 reverse MW:37682
orf01900	26	0	26	>orf01900 orf01900 acetyltransferase, GNAT family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1617746:1618630 forward MW:33674
orf01903	26	0	26	>orf01903 orf01903 hypothetical protein spr0521 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1620443:1621327 forward MW:34361
orf01909	26	0	26	>orf01909 orf01909 transmembrane protein Vexp3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1624721:1626100 forward MW:49985
orf01912	26	0	26	>orf01912 orf01912 cysteinyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1627064:1628392 forward MW:50556
orf01926	26	0	26	>orf01926 orf01926 hypothetical protein SpneT_02001253 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1641972:1642673 forward MW:26731
orf01929	26	0	26	>orf01929 orf01929 amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1645562:1646362 reverse MW:29615
orf01961	26	0	26	>orf01961 orf01961 competence protein ComF, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1664907:1665569 forward MW:25241
orf01967	26	0	26	>orf01967 orf01967 Choline binding protein D [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1670506:1671624 forward MW:41724
orf01996	26	0	26	>orf01996 orf01996 DNA mismatch repair protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1694660:1695865 reverse MW:45090
orf01997	26	0	26	>orf01997 orf01997 riboflavin synthase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1695885:1696520 reverse MW:23259
orf01998	26	0	26	>orf01998 orf01998 riboflavin synthase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1696505:1697605 reverse MW:40594
orf02003	26	0	26	>orf02003 orf02003 hypothetical protein SP_0184 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1701290:1701973 reverse MW:25789
orf02009	26	0	26	>orf02009 orf02009 hypothetical protein SP_0191 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1707542:1708111 forward MW:21009
orf02072	26	0	26	>orf02072 orf02072 iron-compound ABC transporter, iron-compound-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 1746756:1747721 reverse MW:34806
orf02074	26	0	26	>orf02074 orf02074 iron-compound ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1748566:1749522 reverse MW:36329
orf02080	26	0	26	>orf02080 orf02080 hypothetical protein SP_1864 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1753082:1753378 forward MW:11228
orf02116	26	0	26	>orf02116 orf02116 hypothetical protein CGSSp14BS69_10426 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1784257:1784916 forward MW:26057
orf02118	26	0	26	>orf02118 orf02118 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1786111:1787121 forward MW:37444
orf02119	26	0	26	>orf02119 orf02119 ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1787133:1788824 forward MW:62655
orf02121	26	0	26	>orf02121 orf02121 MgtC/SapB family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1788827:1789537 forward MW:25551
orf02122	26	0	26	>orf02122 orf02122 sugar-binding transcriptional regulator, LacI family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1790109:1791110 forward MW:37659
orf02172	26	0	26	>orf02172 orf02172 hypothetical protein SP_0153 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1827225:1827794 reverse MW:20158
orf02179	26	0	26	>orf02179 orf02179 hypothetical protein CGSSp19BS75_11308 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1834487:1834945 reverse MW:17612
orf02180	26	0	26	>orf02180 orf02180 hypothetical protein CGSSp19BS75_11313 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1834942:1835382 reverse MW:17152
orf02204	26	0	26	>orf02204 orf02204 hypothetical protein spr0296 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1853078:1853371 reverse MW:10892
orf02209	26	0	26	>orf02209 orf02209 PTS system, IIA component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1856674:1857108 reverse MW:15405

<u>orf02212</u>	26	0	26	>orf02212 orf02212 gi 148988075 ref ZP_01819538.1 keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1859237:1859887 forward MW:24429
<u>orf02226</u>	26	0	26	>orf02226 orf02226 DNA polymerase III, delta prime subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1869854:1870744 reverse MW:34359
<u>orf02232</u>	26	0	26	>orf02232 orf02232 spermidine synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1874882:1876777 reverse MW:72335
<u>orf02256</u>	26	0	26	>orf02256 orf02256 site-specific tyrosine recombinase XerD-like protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1895604:1896344 forward MW:28701
<u>orf02265</u>	26	0	26	>orf02265 orf02265 cell wall surface anchor family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1901682:1906985 forward MW:196134
<u>orf02273</u>	26	0	26	>orf02273 orf02273 hypothetical protein SpneCD_01145 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1912551:1913945 forward MW:51519
<u>orf02277</u>	26	0	26	>orf02277 orf02277 choline binding protein C [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1916244:1917263 forward MW:39577
<u>orf02281</u>	26	0	26	>orf02281 orf02281 choline binding protein C [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1920350:1920472 forward MW:4617
<u>orf02284</u>	26	0	26	>orf02284 orf02284 phosphomevalonate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1922394:1923401 forward MW:37071
<u>orf02288</u>	26	0	26	>orf02288 orf02288 sensor histidine kinase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1925168:1926163 forward MW:37923
<u>orf02318</u>	26	0	26	>orf02318 orf02318 transcriptional regulator ComX2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1941208:1941585 forward MW:15595
<u>orf02337</u>	26	0	26	>orf02337 orf02337 hypothetical protein SP_1127 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1955323:1955769 reverse MW:17093
<u>orf02380</u>	26	0	26	>orf02380 orf02380 hypothetical protein spr1708 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1984180:1985373 reverse MW:45208
<u>orf02413</u>	26	0	26	>orf02413 orf02413 hypothetical protein SP_1077 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2015118:2015294 forward MW:6272
<u>orf02416</u>	26	0	26	>orf02416 orf02416 hypothetical protein SP_1080 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2016871:2017029 forward MW:5988
<u>orf02430</u>	26	0	26	>orf02430 orf02430 hypothetical protein spr0999 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 2027817:2027960 reverse MW:5320
<u>orf02434</u>	26	0	26	>orf02434 orf02434 adenylate cyclase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 2030586:2031155 reverse MW:22366
<u>orf00007</u>	26	1	27	>orf00007 orf00007 hypothetical protein spr0024 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 8312:8869 forward MW:21399
<u>orf00186</u>	26	1	27	>orf00186 orf00186 recombination helicase AddA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 161698:165348 reverse MW:140123
<u>orf00262</u>	26	1	27	>orf00262 orf00262 prephenate dehydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 232994:233470 forward MW:17802
<u>orf00435</u>	26	1	27	>orf00435 orf00435 bifunctional ATP-dependent DNA helicase/DNA polymerase III subunit epsilon [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 377933:378433 reverse MW:19087
<u>orf00439</u>	26	1	27	>orf00439 orf00439 oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 379471:380397 reverse MW:35165
<u>orf00462</u>	26	1	27	>orf00462 orf00462 hypothetical protein SP_0748 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 392025:392273 forward MW:9940
<u>orf00484</u>	26	1	27	>orf00484 orf00484 hypothetical protein CGSSp9BS68_08427 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 410827:411357 forward MW:21055
<u>orf00567</u>	26	1	27	>orf00567 orf00567 pyridoxine biosynthesis protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 483504:484379 reverse MW:31741
<u>orf00570</u>	26	1	27	>orf00570 orf00570 thiamine biosynthesis protein AphE, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 486204:487127 forward MW:33815
<u>orf00638</u>	26	1	27	>orf00638 orf00638 tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 551812:552210 reverse MW:15085
<u>orf00643</u>	26	1	27	>orf00643 orf00643 hypothetical protein spr0695 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 556307:557566 reverse MW:45278
<u>orf00699</u>	26	1	27	>orf00699 orf00699 hypothetical protein SP_1560 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 596689:597468 forward MW:27877
<u>orf00786</u>	26	1	27	>orf00786 orf00786 competence protein CeiA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 667121:667771 forward MW:23219
<u>orf00822</u>	26	1	27	>orf00822 orf00822 hypothetical protein CGSSp18BS74_03454 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 696579:697367 reverse MW:29611
<u>orf00825</u>	26	1	27	>orf00825 orf00825 hypothetical protein SP_0990 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 699457:699771 forward MW:11809
<u>orf00882</u>	26	1	27	>orf00882 orf00882 GTP cyclohydrolase I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 758288:758848 forward MW:20987
<u>orf00908</u>	26	1	27	>orf00908 orf00908 lactose phosphotransferase system repressor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 777958:778719 reverse MW:28432
<u>orf00924</u>	26	1	27	>orf00924 orf00924 phosphate transport system regulatory protein PhoU [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 792143:792793 reverse MW:24238

orf00971	26	1	27	>orf00971 orf00971 hypothetical protein spr0568 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 825294:825653 forward MW:14068
orf01019	26	1	27	>orf01019 orf01019 acyl carrier protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 874478:874711 reverse MW:8834
orf01129	26	1	27	>orf01129 orf01129 acetyltransferase, GNAT family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 962286:962804 forward MW:19339
orf01202	26	1	27	>orf01202 orf01202 hypothetical protein spr2029 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1021837:1023120 forward MW:49014
orf01291	26	1	27	>orf01291 orf01291 hypothetical protein CGSSp18BS74_05527 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1091733:1092362 forward MW:22965
orf01345	26	1	27	>orf01345 orf01345 L-fucose isomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1142825:1144591 forward MW:65814
orf01346	26	1	27	>orf01346 orf01346 alcohol dehydrogenase, iron-containing [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1144737:1145888 forward MW:41224
orf01359	26	1	27	>orf01359 orf01359 ROK family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1163612:1164481 forward MW:31422
orf01360	26	1	27	>orf01360 orf01360 glycosyl hydrolase-related protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1164475:1166355 forward MW:71765
orf01366	26	1	27	>orf01366 orf01366 hypothetical protein SpneT_02001217 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1168028:1168306 forward MW:10045
orf01390	26	1	27	>orf01390 orf01390 topology modulation protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1194118:1194642 reverse MW:21101
orf01447	26	1	27	>orf01447 orf01447 transcriptional repressor, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1237973:1238404 forward MW:16197
orf01554	26	1	27	>orf01554 orf01554 transcriptional regulator, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1323514:1323909 reverse MW:15148
orf01574	26	1	27	>orf01574 orf01574 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1340823:1341470 reverse MW:23859
orf01620	26	1	27	>orf01620 orf01620 MesH protease [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1386683:1387114 reverse MW:16590
orf01772	26	1	27	>orf01772 orf01772 hypothetical protein SP_1803 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1507454:1507624 forward MW:6301
orf01968	26	1	27	>orf01968 orf01968 hypothetical protein SP_2199 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1671880:1672170 forward MW:10718
orf02086	26	1	27	>orf02086 orf02086 transporter, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1757872:1758678 forward MW:31030
orf02089	26	1	27	>orf02089 orf02089 transcriptional regulator, MerR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1760648:1761001 forward MW:13463
orf02149	26	1	27	>orf02149 orf02149 CrcB protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1810488:1810862 reverse MW:13740
orf02194	26	1	27	>orf02194 orf02194 cell division protein FtsL [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1847188:1847505 reverse MW:12206
orf02240	26	1	27	>orf02240 orf02240 Beta-alanine synthase or beta-ureidopropionase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1881473:1882348 reverse MW:33153
orf02241	26	1	27	>orf02241 orf02241 hypothetical protein CGSSp6BS73_06000 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1882358:1883443 reverse MW:40302
orf02242	26	1	27	>orf02242 orf02242 carboxynorspermidine decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1883440:1884567 reverse MW:41947
orf02244	26	1	27	>orf02244 orf02244 spermidine synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1885823:1886683 reverse MW:32859
orf02286	26	1	27	>orf02286 orf02286 hypothetical protein spr0342 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1924473:1925171 forward MW:27162
orf02428	26	1	27	>orf02428 orf02428 glutamine amidotransferase, class I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2026386:2027075 reverse MW:25812
orf00025	26	2	28	>orf00025 orf00025 acetyltransferase, GNAT family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 22957:23466 reverse MW:19740
orf00036	26	2	28	>orf00036 orf00036 Cof family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 33879:34646 reverse MW:28492
orf00037	26	2	28	>orf00037 orf00037 chromosome segregation protein SMC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 34670:38209 reverse MW:134132
orf00053	26	2	28	>orf00053 orf00053 copper homeostasis protein CutC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 48051:48683 reverse MW:23086
orf00054	26	2	28	>orf00054 orf00054 hypothetical protein spr1140 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 48776:49135 reverse MW:13710
orf00159	26	2	28	>orf00159 orf00159 hypothetical protein SpneT_02001660 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 131642:132331 reverse MW:25492
orf00179	26	2	28	>orf00179 orf00179 ribonuclease HIII [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 150679:152229 reverse MW:56460
orf00219	26	2	28	>orf00219 orf00219 transcriptional regulator Spx [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 197114:197851 forward MW:28391
orf00247	26	2	28	>orf00247 orf00247 hypothetical protein SpneT_02000254 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 217324:217809 forward MW:18801
orf00260	26	2	28	>orf00260 orf00260 hypothetical protein spr1230 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 231288:231626 forward MW:12480

orf00272	26	2	28	>orf00272 orf00272 adaptor protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 241503:242240 forward MW:28409
orf00348	26	2	28	>orf00348 orf00348 hypothetical protein spr0799 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 297625:298497 reverse MW:32690
orf00351	26	2	28	>orf00351 orf00351 hypothetical protein CGSSp3BS71_03222 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 300108:301061 reverse MW:36406
orf00360	26	2	28	>orf00360 orf00360 hypothetical protein spr1590 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 307462:307962 forward MW:19196
orf00374	26	2	28	>orf00374 orf00374 serine/threonine protein kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 319197:321176 forward MW:72317
orf00396	26	2	28	>orf00396 orf00396 hypothetical protein spr0777 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 340220:341251 reverse MW:38047
orf00414	26	2	28	>orf00414 orf00414 GDSL-like lipase/acylhydrolase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 354649:355284 forward MW:24000
orf00422	26	2	28	>orf00422 orf00422 septation ring formation regulator EzrA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 361613:363340 reverse MW:66521
orf00425	26	2	28	>orf00425 orf00425 4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 366031:366585 reverse MW:20182
orf00457	26	2	28	>orf00457 orf00457 transcriptional regulator, TetR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 389421:389978 forward MW:21674
orf00527	26	2	28	>orf00527 orf00527 hypothetical protein spr1508 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 450218:450757 forward MW:20637
orf00630	26	2	28	>orf00630 orf00630 Ribosomal protein alanine acetyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 545087:545524 reverse MW:16387
orf00678	26	2	28	>orf00678 orf00678 transcriptional repressor CodY [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 582245:583003 forward MW:27991
orf00681	26	2	28	>orf00681 orf00681 hypothetical protein SP_1575 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 584737:585414 forward MW:25651
orf00687	26	2	28	>orf00687 orf00687 gi 10732763 gb AAG22526.1 AF288417_1 dihydrofolate reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 588956:589462 forward MW:19677
orf00731	26	2	28	>orf00731 orf00731 hypothetical protein SP_2027 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 628367:628777 reverse MW:15147
orf00805	26	2	28	>orf00805 orf00805 dephospho-CoA kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39] 682773:683378 forward MW:22978
orf00929	26	2	28	>orf00929 orf00929 sensor histidine kinase PnpS [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 796393:797724 reverse MW:49727
orf00947	26	2	28	>orf00947 orf00947 hypothetical protein spr1454 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 808585:809214 reverse MW:24646
orf01041	26	2	28	>orf01041 orf01041 adenylosuccinate lyase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 891833:892885 forward MW:38819
orf01063	26	2	28	>orf01063 orf01063 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 910816:911700 forward MW:33510
orf01071	26	2	28	>orf01071 orf01071 Cof family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 917031:918419 forward MW:51898
orf01098	26	2	28	>orf01098 orf01098 OxaA-like protein precursor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 937090:938016 reverse MW:34105
orf01130	26	2	28	>orf01130 orf01130 Regulator of lytRABC operon [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 962812:963828 forward MW:37567
orf01174	26	2	28	>orf01174 orf01174 hypothetical protein SP_0008 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 994895:995263 reverse MW:14805
orf01183	26	2	28	>orf01183 orf01183 spspoJ protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1004057:1004815 reverse MW:29184
orf01184	26	2	28	>orf01184 orf01184 chromosomal replication initiation protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1004873:1006054 reverse MW:41828
orf01189	26	2	28	>orf01189 orf01189 response regulator ComE [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1008467:1009219 forward MW:29958
orf01190	26	2	28	>orf01190 orf01190 transcriptional regulator, TetR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1009462:1010004 reverse MW:21274
orf01210	26	2	28	>orf01210 orf01210 secreted 45 kd protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1028439:1029617 forward MW:41697
orf01222	26	2	28	>orf01222 orf01222 Signal peptidase I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1042433:1042933 reverse MW:18975
orf01256	26	2	28	>orf01256 orf01256 transcription antitermination factor NusB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1066050:1066472 reverse MW:15991
orf01282	26	2	28	>orf01282 orf01282 Rrf2 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1084718:1085155 forward MW:15824
orf01293	26	2	28	>orf01293 orf01293 cadmium resistance transporter, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1093586:1094200 forward MW:22848
orf01310	26	2	28	>orf01310 orf01310 hypothetical protein SpnCDC_04268 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1107653:1109062 forward MW:54858
orf01329	26	2	28	>orf01329 orf01329 Transcriptional repressor for Zn(2+)-responsive expression [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1123431:1123931 forward MW:18897
orf01426	26	2	28	>orf01426 orf01426 hypothetical protein SP_1224 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1222678:1222920 forward MW:9205

orf01427	26	2	28	>orf01427 orf01427 hypothetical protein spr1103 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1222922:1223176 forward MW:10099
orf01512	26	2	28	>orf01512 orf01512 ATP synthase FO, A subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1291133:1291849 reverse MW:27208
orf01536	26	2	28	>orf01536 orf01536 putative oxidoreductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1303171:1304274 reverse MW:41065
orf01538	26	2	28	>orf01538 orf01538 ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1306398:1307231 reverse MW:30459
orf01539	26	2	28	>orf01539 orf01539 ABC transporter membrane-spanning permease - sugar transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1307231:1308115 reverse MW:33590
orf01550	26	2	28	>orf01550 orf01550 hypothetical protein spr0643 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1318439:1318786 reverse MW:12889
orf01551	26	2	28	>orf01551 orf01551 pyruvate oxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1318897:1320672 reverse MW:65280
orf01589	26	2	28	>orf01589 orf01589 ribosomal small subunit pseudouridine synthase A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1355369:1356094 forward MW:27031
orf01675	26	2	28	>orf01675 orf01675 hypothetical protein SpneT_02000151 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1433086:1433451 forward MW:15117
orf01681	26	2	28	>orf01681 orf01681 hypothetical protein SpneCDC_08134 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1436382:1436843 forward MW:17905
orf01689	26	2	28	>orf01689 orf01689 potassium uptake protein, Trk family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1439939:1441318 reverse MW:50179
orf01700	26	2	28	>orf01700 orf01700 aldose 1-epimerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1445241:1446278 reverse MW:37814
orf01701	26	2	28	>orf01701 orf01701 sugar isomerase domain protein AgaS [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1446394:1447560 reverse MW:43134
orf01708	26	2	28	>orf01708 orf01708 hypothetical protein CGSSp14BS69_09025 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1452525:1453283 forward MW:29584
orf01804	26	2	28	>orf01804 orf01804 hypothetical protein CGSSp3BS71_03047 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1527695:1528312 reverse MW:23223
orf01872	26	2	28	>orf01872 orf01872 transcriptional repressor, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1590863:1591309 reverse MW:17063
orf01889	26	2	28	>orf01889 orf01889 acetyltransferase, GNAT family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1605711:1606220 forward MW:20065
orf01941	26	2	28	>orf01941 orf01941 succinyl-diaminopimelate desuccinylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1652742:1653458 forward MW:26459
orf01969	26	2	28	>orf01969 orf01969 ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1672175:1672891 forward MW:27190
orf01970	26	2	28	>orf01970 orf01970 ABC transporter, substrate-binding protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1672929:1673936 forward MW:37776
orf01977	26	2	28	>orf01977 orf01977 Response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1678317:1678970 forward MW:25218
orf01978	26	2	28	>orf01978 orf01978 Histidine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1678967:1680298 forward MW:50989
orf01984	26	2	28	>orf01984 orf01984 sugar ABC transporter, sugar-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1683964:1685223 reverse MW:46612
orf01987	26	2	28	>orf01987 orf01987 biotin--protein ligase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1688385:1689320 forward MW:35229
orf02081	26	2	28	>orf02081 orf02081 transcriptional regulator, MarR family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1754060:1754503 forward MW:16621
orf02148	26	2	28	>orf02148 orf02148 crcB protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1810165:1810494 reverse MW:12006
orf02150	26	2	28	>orf02150 orf02150 hypothetical protein SP_1296 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1810859:1811125 reverse MW:10508
orf02167	26	2	28	>orf02167 orf02167 ABC transporter, substrate-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1822137:1822967 forward MW:30641
orf02193	26	2	28	>orf02193 orf02193 penicillin-binding protein 2X [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 1844932:1847184 reverse MW:82401
orf02238	26	2	28	>orf02238 orf02238 hypothetical protein spr0824 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1880483:1881292 forward MW:29822
orf02358	26	2	28	>orf02358 orf02358 hypothetical protein SpneT_02001705 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1965796:1966353 forward MW:20713
orf02443	26	2	28	>orf02443 orf02443 hypothetical protein SP_1106 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2036925:2037269 forward MW:12820
orf02448	26	2	28	>orf02448 orf02448 hypothetical protein SP_1111 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2039437:2040285 reverse MW:31267
orf00092	26	3	29	>orf00092 orf00092 hypothetical protein SpneCD_08457 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 80380:80826 forward MW:17418
orf00096	26	3	29	>orf00096 orf00096 hypothetical protein spr1727 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 82438:82755 forward MW:12220
orf00149	26	3	29	>orf00149 orf00149 type I restriction-modification system, M subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 123792:125255 forward MW:56479
orf00224	26	3	29	>orf00224 orf00224 hypothetical protein SP_1404 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 199913:200131 forward MW:7995

orf00441	26	3	29	>orf00441 orf00441 hypothetical protein SP_0789 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 381291:381611 reverse MW:12238
orf00544	26	3	29	>orf00544 orf00544 manganese ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 466396:467118 reverse MW:26844
orf00819	26	3	29	>orf00819 orf00819 phosphoglycerate mutase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 694540:695160 reverse MW:23334
orf00849	26	3	29	>orf00849 orf00849 phosphatidate cytidyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 722664:723467 forward MW:28954
orf00903	26	3	29	>orf00903 orf00903 transcription antiterminator LacT [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 772876:773712 forward MW:32983
orf00926	26	3	29	>orf00926 orf00926 phosphate ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 793562:794377 reverse MW:29130
orf00928	26	3	29	>orf00928 orf00928 phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 795351:796226 reverse MW:30757
orf00935	26	3	29	>orf00935 orf00935 phosphopantothenate--cysteine ligase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 801179:801868 forward MW:25738
orf01045	26	3	29	>orf01045 orf01045 ABC transporter membrane spanning permease - sugar transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 895922:896845 forward MW:34533
orf01046	26	3	29	>orf01046 orf01046 ABC transporter, substrate-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 897055:898530 forward MW:54486
orf01511	26	3	29	>orf01511 orf01511 F0F1 ATP synthase subunit B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1290625:1291119 reverse MW:17986
orf01693	26	3	29	>orf01693 orf01693 phosphorylase, Pnp/Udp family protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1441973:1442737 reverse MW:28217
orf01745	26	3	29	>orf01745 orf01745 hypothetical protein SpneT_02001915 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1485882:1486103 forward MW:8680
orf01764	26	3	29	>orf01764 orf01764 sucrose-6-phosphate hydrolase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1498736:1500055 reverse MW:51170
orf01814	26	3	29	>orf01814 orf01814 transcriptional regulator, GntR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1533606:1533971 reverse MW:13959
orf01983	26	3	29	>orf01983 orf01983 sugar ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1683084:1683950 reverse MW:32091
orf01985	26	3	29	>orf01985 orf01985 alpha-galactosidase AgaN [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1685258:1687420 reverse MW:81648
orf02002	26	3	29	>orf02002 orf02002 MccC family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1700004:1701035 reverse MW:38819
orf02076	26	3	29	>orf02076 orf02076 iron-compound ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1749512:1750471 reverse MW:35457
orf02270	26	3	29	>orf02270 orf02270 hypothetical protein spr0332 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1910567:1910896 forward MW:12575
orf00216	26	4	30	>orf00216 orf00216 hypothetical protein SP_1411 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 195107:195490 forward MW:13707
orf00222	26	4	30	>orf00222 orf00222 coproporphyrinogen III oxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 198625:199242 forward MW:24115
orf00377	26	4	30	>orf00377 orf00377 hypothetical protein SP_1730 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 322051:322500 forward MW:16151
orf00561	26	4	30	>orf00561 orf00561 hypothetical protein SP_1462 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 480302:480658 reverse MW:13387
orf00647	26	4	30	>orf00647 orf00647 biotin synthase (BioY family protein), putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 561280:561816 forward MW:18688
orf00744	26	4	30	>orf00744 orf00744 protein jag (SpoIIJ-associated protein), putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 640196:641182 reverse MW:37037
orf00745	26	4	30	>orf00745 orf00745 hypothetical protein spr1852 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 641201:641974 reverse MW:29149
orf00811	26	4	30	>orf00811 orf00811 tellurite resistance protein TehB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 687888:688748 forward MW:32743
orf00828	26	4	30	>orf00828 orf00828 DNA polymerase III subunit epsilon [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 701146:701736 forward MW:22135
orf00953	26	4	30	>orf00953 orf00953 UDP-glucose 4-epimerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 812117:813136 reverse MW:37434
orf01148	26	4	30	>orf01148 orf01148 maltose/maltodextrin ABC transporter, maltose/maltodextrin-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 977251:978522 reverse MW:45395
orf01149	26	4	30	>orf01149 orf01149 4-alpha-glucanotransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 979072:980589 forward MW:58050
orf01449	26	4	30	>orf01449 orf01449 Serine/threonine protein phosphatase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1240080:1240808 forward MW:27219
orf01584	26	4	30	>orf01584 orf01584 ABC transporter ATP-binding protein - sodium transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1349695:1350336 reverse MW:23972
orf01635	26	4	30	>orf01635 orf01635 hypothetical protein CGSSp9BS68_03988 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1398504:1399118 forward MW:22915
orf01677	26	4	30	>orf01677 orf01677 Competence protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1434584:1435432 forward MW:32057

orf01918	26	4	30	>orf01918 orf01918 amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1632579:1633343 reverse MW:28247
orf02082	26	4	30	>orf02082 orf02082 hypothetical protein SpnC_08322 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 1754507:1755271 forward MW:29343
orf02087	26	4	30	>orf02087 orf02087 transcriptional regulator, TetR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1758845:1759381 reverse MW:21233
orf02088	26	4	30	>orf02088 orf02088 hypothetical protein SpneT_02000633 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1759514:1760404 forward MW:33127
orf02282	26	4	30	>orf02282 orf02282 mevalonate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1920594:1921472 forward MW:31494
orf02373	26	4	30	>orf02373 orf02373 hypothetical protein SP_0451 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1976010:1976225 reverse MW:8193
orf00098	26	5	31	>orf00098 orf00098 Oxidoreductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 83430:84191 forward MW:27561
orf00166	26	5	31	>orf00166 orf00166 hydrolase, haloacid dehalogenase-like family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 137216:137929 forward MW:27147
orf00313	26	5	31	>orf00313 orf00313 hypothetical protein spr0475 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 274420:275151 reverse MW:28902
orf00353	26	5	31	>orf00353 orf00353 hypothetical protein spr1597 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 302486:303046 forward MW:20749
orf00354	26	5	31	>orf00354 orf00354 magnesium transporter, CorA family protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 303103:304011 forward MW:34782
orf00376	26	5	31	>orf00376 orf00376 hypothetical protein spr1576 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 321291:322049 forward MW:27255
orf00420	26	5	31	>orf00420 orf00420 IS66 family element, Orf2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 360669:360884 forward MW:8327
orf00459	26	5	31	>orf00459 orf00459 cytidine and deoxycytidylate deaminase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 389997:390464 forward MW:17395
orf00482	26	5	31	>orf00482 orf00482 DNA polymerase III subunit delta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 408856:409893 forward MW:39712
orf00517	26	5	31	>orf00517 orf00517 penicillin-binding protein 2B [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 439946:441988 forward MW:73861
orf00530	26	5	31	>orf00530 orf00530 cell division protein DivIVA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 451811:452599 forward MW:30171
orf00578	26	5	31	>orf00578 orf00578 oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 494086:494928 reverse MW:31416
orf00596	26	5	31	>orf00596 orf00596 hypothetical protein SpneT_02001644 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 514016:514579 reverse MW:20835
orf00656	26	5	31	>orf00656 orf00656 x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 566065:568338 reverse MW:86885
orf00696	26	5	31	>orf00696 orf00696 thioredoxin reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 594741:595709 reverse MW:35240
orf00939	26	5	31	>orf00939 orf00939 hypothetical protein spr1114 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 803799:804314 forward MW:19624
orf00951	26	5	31	>orf00951 orf00951 Ferredoxin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 810983:811099 forward MW:4321
orf01000	26	5	31	>orf01000 orf01000 hypothetical protein CGSSp6BS73_11956 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 855190:855738 reverse MW:19419
orf01143	26	5	31	>orf01143 orf01143 maltose operon transcriptional repressor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 972955:973941 reverse MW:37043
orf01224	26	5	31	>orf01224 orf01224 hypothetical protein SpneT_02001178 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1044097:1044321 forward MW:8525
orf01286	26	5	31	>orf01286 orf01286 sensor histidine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1087516:1088490 forward MW:38098
orf01502	26	5	31	>orf01502 orf01502 hypothetical protein CGSSp11BS70_01072 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1282166:1283395 reverse MW:47494
orf01503	26	5	31	>orf01503 orf01503 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1283385:1284551 reverse MW:43284
orf01505	26	5	31	>orf01505 orf01505 hypothetical protein SP_1506 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1284695:1285708 forward MW:37757
orf01688	26	5	31	>orf01688 orf01688 potassium uptake protein, Trk family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1439545:1439925 reverse MW:13282
orf01702	26	5	31	>orf01702 orf01702 PTS system, IIA component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1447813:1448151 reverse MW:12193
orf01771	26	5	31	>orf01771 orf01771 hypothetical protein SP_1802 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1506876:1507442 forward MW:21815
orf01852	26	5	31	>orf01852 orf01852 hypothetical protein SP_1531 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1567916:1568113 forward MW:6766
orf01860	26	5	31	>orf01860 orf01860 aminotransferase, class II [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1576597:1577763 forward MW:44512
orf01979	26	5	31	>orf01979 orf01979 hypothetical protein SP_2191 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1680381:1680908 forward MW:20239
orf02006	26	5	31	>orf02006 orf02006 peptidase M24 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 1705885:1706946 forward MW:39398

orf02230	26	5	31	>orf02230 orf02230 gamma-glutamyl phosphate reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1872400:1873662 reverse MW:45225
orf02255	26	5	31	>orf02255 orf02255 CBS domain protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1895152:1895613 forward MW:17299
orf02269	26	5	31	>orf02269 orf02269 hypothetical protein spr0331 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1909970:1910497 forward MW:20706
orf02379	26	5	31	>orf02379 orf02379 oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein AmiA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1981515:1983494 reverse MW:72463
orf02427	26	5	31	>orf02427 orf02427 DNA repair protein RadC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2025709:2026389 forward MW:25535
orf00702	26	6	32	>orf00702 orf00702 degV family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 599294:600142 forward MW:30965
orf00751	26	6	32	>orf00751 orf00751 IS1381 transposase protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 645138:645440 forward MW:11379
orf00769	26	6	32	>orf00769 orf00769 IS1381, transposase OrfA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 658015:658416 reverse MW:15355
orf00795	26	6	32	>orf00795 orf00795 lactoylglutathione lyase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 673704:674084 forward MW:14438
orf00835	26	6	32	>orf00835 orf00835 pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 707563:708879 reverse MW:47147
orf01101	26	6	32	>orf01101 orf01101 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 939202:939885 forward MW:24762
orf01121	26	6	32	>orf01121 orf01121 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 956747:957379 reverse MW:23751
orf01246	26	6	32	>orf01246 orf01246 acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1060967:1061452 forward MW:17019
orf01445	26	6	32	>orf01445 orf01445 geranyltranstransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1236297:1237172 forward MW:31868
orf01591	26	6	32	>orf01591 orf01591 hypothetical protein SP_0678 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1356450:1356830 reverse MW:14577
orf01774	26	6	32	>orf01774 orf01774 hypothetical protein SpneCD_07214 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1508302:1508505 forward MW:7169
orf01785	26	6	32	>orf01785 orf01785 anthranilate phosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1515324:1516328 reverse MW:35905
orf01827	26	6	32	>orf01827 orf01827 4'-phosphopantetheinyl transferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1546834:1547202 forward MW:13647
orf01877	26	6	32	>orf01877 orf01877 Degenerate transposase (orf1) [<i>Streptococcus pneumoniae</i> MLV-016] 1595596:1596003 forward MW:15482
orf01923	26	6	32	>orf01923 orf01923 tributyrin esterase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1638545:1639324 forward MW:29912
orf01937	26	6	32	>orf01937 orf01937 hypothetical protein SpneT_02001558 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1649801:1651126 forward MW:46650
orf02178	26	6	32	>orf02178 orf02178 hypothetical protein SP_0159 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1832915:1834177 reverse MW:45926
orf02213	26	6	32	>orf02213 orf02213 gi 15900249 ref NP_344853.1 keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1859897:1860526 forward MW:22068
orf02219	26	6	32	>orf02219 orf02219 IS1381, transposase OrfA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1866401:1866799 forward MW:15169
orf02357	26	6	32	>orf02357 orf02357 cytochrome c-type biogenesis protein CcdA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1965078:1965785 forward MW:25890
orf02362	26	6	32	>orf02362 orf02362 Degenerate transposase (orf1) [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1970230:1970553 forward MW:12603
orf02422	26	6	32	>orf02422 orf02422 IS1381, transposase OrfA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 2022468:2022692 forward MW:8604
orf02432	26	6	32	>orf02432 orf02432 aminotransferase, class V [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 2028392:2029507 reverse MW:40735
orf00255	26	7	33	>orf00255 orf00255 shikimate 5-dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 227048:227902 forward MW:31342
orf00259	26	7	33	>orf00259 orf00259 prephenate dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 230174:231277 forward MW:41030
orf01229	26	7	33	>orf01229 orf01229 hypothetical protein SP_0409 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1049189:1049737 forward MW:19815
orf01704	26	7	33	>orf01704 orf01704 PTS system, IIC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1449026:1449931 reverse MW:31897
orf01781	26	7	33	>orf01781 orf01781 tryptophan synthase, alpha subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1512004:1512780 reverse MW:27728
orf01782	26	7	33	>orf01782 orf01782 tryptophan synthase subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1512773:1513996 reverse MW:44279
orf01786	26	7	33	>orf01786 orf01786 anthranilate synthase component II [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1516339:1516905 reverse MW:20927
orf01788	26	7	33	>orf01788 orf01788 anthranilate synthase component I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1516902:1518263 reverse MW:51201

orf01908	26	7	33	>orf01908 orf01908 ABC transporter, ATP-binding protein Vexp2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1624022:1624669 forward MW:23825
orf01925	26	7	33	>orf01925 orf01925 beta-lactam resistance factor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1640661:1641893 forward MW:47331
orf00101	26	8	34	>orf00101 orf00101 co-chaperonin GroES [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 84934:85218 forward MW:9912
orf00334	26	8	34	>orf00334 orf00334 ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 287789:288547 reverse MW:28177
orf00433	26	8	34	>orf00433 orf00433 hypothetical protein SpneCD_02070 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 376671:377111 reverse MW:16580
orf00734	26	8	34	>orf00734 orf00734 transketolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 629664:631646 reverse MW:71313
orf01285	26	8	34	>orf01285 orf01285 hypothetical protein SpneT_02001263 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1086846:1087523 forward MW:25964
orf01305	26	8	34	>orf01305 orf01305 cytidylate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1102742:1104712 forward MW:70872
orf01630	26	8	34	>orf01630 orf01630 HemK protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1394346:1395185 forward MW:31755
orf01705	26	8	34	>orf01705 orf01705 Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1449959:1450435 reverse MW:17228
orf01706	26	8	34	>orf01706 orf01706 Beta-galactosidase 3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39] 1450432:1452219 reverse MW:69011
orf01895	26	8	34	>orf01895 orf01895 gi 149010795 ref ZP_01832166.1 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1611024:1613273 forward MW:84677
orf01896	26	8	34	>orf01896 orf01896 polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1613337:1614203 forward MW:32113
orf01911	26	8	34	>orf01911 orf01911 DNA-binding response regulator VncR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1626411:1627067 forward MW:24966
orf02307	26	8	34	>orf02307 orf02307 hypothetical protein CGSSp14BS69_01289 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1933546:1934880 forward MW:51345
orf00941	26	9	35	>orf00941 orf00941 hypothetical protein SpneCDC_07282 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 804925:805386 reverse MW:16377
orf01002	26	9	35	>orf01002 orf01002 hypothetical protein SP_0481 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 855753:856601 reverse MW:31451
orf01395	26	9	35	>orf01395 orf01395 pyrimidine-nucleoside phosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1197270:1198547 forward MW:46141
orf01468	26	9	35	>orf01468 orf01468 hypothetical protein SP_2125 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1254069:1254410 reverse MW:12810
orf01653	26	9	35	>orf01653 orf01653 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase-related protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1414194:1414892 forward MW:23919
orf01995	26	9	35	>orf01995 orf01995 riboflavin synthase, beta subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1694192:1694659 reverse MW:16752
orf02139	26	9	35	>orf02139 orf02139 Uracil permease [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP195] 1803474:1804757 forward MW:44878
orf02306	26	9	35	>orf02306 orf02306 hypothetical protein SP_0561 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1933313:1933546 forward MW:8396
orf02405	26	9	35	>orf02405 orf02405 hypothetical protein SP_1069 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2006589:2007593 forward MW:35102
orf00127	26	10	36	>orf00127 orf00127 hypothetical protein CGSSp9BS68_01433 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 104793:106346 forward MW:58350
orf00238	26	10	36	>orf00238 orf00238 alpha-acetolactate decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 210097:210828 forward MW:27328
orf00692	26	10	36	>orf00692 orf00692 endoribonuclease L-PSP [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 591503:591883 forward MW:13731
orf01095	26	10	36	>orf01095 orf01095 OxaA-like protein precursor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 934845:936095 forward MW:46639
orf01145	26	10	36	>orf01145 orf01145 maltodextrin ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 975004:975846 reverse MW:31507
orf01268	26	10	36	>orf01268 orf01268 acetolactate synthase catalytic subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1075969:1077669 forward MW:61720
orf01269	26	10	36	>orf01269 orf01269 hypothetical protein SpneT_02000910 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1077671:1078138 forward MW:17251
orf01271	26	10	36	>orf01271 orf01271 ketol-acid reductoisomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1078204:1079226 forward MW:37380
orf01274	26	10	36	>orf01274 orf01274 threonine dehydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1080213:1081463 forward MW:45463
orf01279	26	10	36	>orf01279 orf01279 iron-dependent transcriptional regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1083038:1083688 reverse MW:24858
orf01396	26	10	36	>orf01396 orf01396 pyrimidine-nucleoside phosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1198565:1199227 forward MW:22902
orf01466	26	10	36	>orf01466 orf01466 dihydroxy-acid dehydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1252067:1253770 forward MW:59859

orf01654	26	10	36	>orf01654 orf01654 peptidase, M20/M25/M40 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1414960:1416090 forward MW:41621
orf01727	26	10	36	>orf01727 orf01727 competence factor transporting ATP-binding/permease protein ComA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1474034:1476187 reverse MW:80471
orf01825	26	10	36	>orf01825 orf01825 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1544731:1545762 forward MW:38794
orf01826	26	10	36	>orf01826 orf01826 phospho-2-dehydro-3-heoxyheptonate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1545764:1546795 forward MW:38753
orf02130	26	10	36	>orf02130 orf02130 penicillin-binding protein 2A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1796273:1798468 forward MW:80783
orf00703	26	11	37	>orf00703 orf00703 dihydrodipicolinate reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 600419:601186 forward MW:27836
orf00855	26	11	37	>orf00855 orf00855 oxidoreductase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 730211:731260 forward MW:38869
orf01040	26	11	37	>orf01040 orf01040 DNA-binding response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 891138:891836 forward MW:26710
orf01146	26	11	37	>orf01146 orf01146 maltodextrin ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 975848:977140 reverse MW:47773
orf01464	26	11	37	>orf01464 orf01464 hypothetical protein CGSSp6BS73_06818 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1250048:1250905 forward MW:32010
orf01465	26	11	37	>orf01465 orf01465 ascorbate-specific PTS system enzyme IIC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1250902:1251834 forward MW:34521
orf01623	26	11	37	>orf01623 orf01623 dihydrodipicolinate synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1389392:1390327 forward MW:33912
orf01834	26	11	37	>orf01834 orf01834 hypothetical protein CGSSp18BS74_10974 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1556972:1557520 reverse MW:19781
orf02053	26	11	37	>orf02053 orf02053 hypothetical protein SP_0238 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1734290:1734556 forward MW:9671
orf02257	26	11	37	>orf02257 orf02257 segregation and condensation protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1896344:1897072 forward MW:28270
orf02412	26	11	37	>orf02412 orf02412 glycosyl transferase, group 1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2013762:2015087 forward MW:50339
orf00424	26	12	38	>orf00424 orf00424 Phosphoglycolate phosphatase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 365383:365946 reverse MW:21160
orf00572	26	12	38	>orf00572 orf00572 pyridoxine biosynthesis protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 487811:489055 forward MW:45870
orf00925	26	12	38	>orf00925 orf00925 phosphate ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 792808:793560 reverse MW:28080
orf01960	26	12	38	>orf01960 orf01960 helicase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1663612:1664910 forward MW:49591
orf02196	26	12	38	>orf02196 orf02196 transcriptional regulator, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1848633:1848827 forward MW:7532
orf00717	26	13	39	>orf00717 orf00717 nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 616764:617636 reverse MW:31621
orf00719	26	13	39	>orf00719 orf00719 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 617873:619183 forward MW:47439
orf01118	26	13	39	>orf01118 orf01118 nucleoside diphosphate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 955406:955819 forward MW:15439
orf01415	26	13	39	>orf01415 orf01415 hypothetical protein SP_0858 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1213861:1214550 forward MW:24973
orf01416	26	13	39	>orf01416 orf01416 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1214547:1215470 forward MW:32775
orf01569	26	13	39	>orf01569 orf01569 lactate oxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1337434:1337580 reverse MW:5220
orf02094	26	13	39	>orf02094 orf02094 hypothetical protein SP_1851 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1766005:1766409 forward MW:14945
orf02330	26	13	39	>orf02330 orf02330 glycogen branching enzyme [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1947879:1949807 forward MW:75615
orf00075	26	14	40	>orf00075 orf00075 endonuclease III [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 68568:69197 reverse MW:23277
orf00470	26	14	40	>orf00470 orf00470 acetoin utilization protein AcuB, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 397464:398120 forward MW:24189
orf00942	26	14	40	>orf00942 orf00942 phosphomethylpyrimidine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 805383:806138 reverse MW:26978
orf01066	26	14	40	>orf01066 orf01066 DNA-binding response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 913538:914137 forward MW:22262
orf01461	26	14	40	>orf01461 orf01461 PTS system, IIB component, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1248401:1248685 forward MW:10105
orf01462	26	14	40	>orf01462 orf01462 PTS system, IIC component, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1248698:1250044 forward MW:46830
orf01972	26	14	40	>orf01972 orf01972 transcriptional regulator CtsR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1674783:1675241 forward MW:17557
orf02056	26	14	40	>orf02056 orf02056 Phosphoglycerate mutase 2 paralog [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1736147:1736839 forward MW:25754

orf02093	26	14	40	>orf02093 orf02093 galactose-1-phosphate uridylyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1764451:1765935 forward MW:56394
orf01003	26	15	41	>orf01003 orf01003 potassium uptake protein, Trk family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 856790:858139 forward MW:49846
orf01004	26	15	41	>orf01004 orf01004 DNA polymerase IV [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 858155:859582 forward MW:52450
orf01668	26	15	41	>orf01668 orf01668 pyrrolidone-carboxylate peptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1425692:1426123 forward MW:15799
orf01669	26	15	41	>orf01669 orf01669 pyrrolidone-carboxylate peptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1426123:1426335 forward MW:7952
orf01939	26	15	41	>orf01939 orf01939 hypothetical protein SpneCDC_01275 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1651224:1652261 forward MW:38048
orf00698	26	16	42	>orf00698 orf00698 hypothetical protein spr1419 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 595845:596702 forward MW:31853
orf02177	26	16	42	>orf02177 orf02177 hypothetical protein SP_0158 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1832152:1832622 forward MW:17569
orf00598	26	17	43	>orf00598 orf00598 hypothetical protein SpneCDC_00570 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 515728:516171 reverse MW:16869
orf01058	26	17	43	>orf01058 orf01058 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 906442:908124 reverse MW:62836
orf01611	26	17	43	>orf01611 orf01611 DNA-binding response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1376469:1377206 reverse MW:28262
orf00257	26	18	44	>orf00257 orf00257 3-dehydroquinate synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 227921:228988 forward MW:39028
orf00541	26	18	44	>orf00541 orf00541 thiol peroxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 463976:464467 reverse MW:18030
orf00853	26	18	44	>orf00853 orf00853 prolyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 726713:728092 forward MW:53229
orf00866	26	18	44	>orf00866 orf00866 aminopeptidase PepS [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 744309:745550 forward MW:45176
orf01357	26	18	44	>orf01357 orf01357 hypothetical protein spr1952 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1159512:1160792 forward MW:49036
orf01499	26	18	44	>orf01499 orf01499 amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1279891:1280727 reverse MW:31020
orf01594	26	18	44	>orf01594 orf01594 oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1358125:1358880 reverse MW:27750
orf01799	26	18	44	>orf01799 orf01799 Sucrose-6-phosphate hydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1522625:1524079 reverse MW:55323
orf02106	26	18	44	>orf02106 orf02106 ABC transporter, ATP-binding/permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1774341:1776086 forward MW:65298
orf02216	26	18	44	>orf02216 orf02216 glutathione peroxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1865098:1865574 forward MW:18000
orf00467	26	19	45	>orf00467 orf00467 branched-chain amino acid ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 395631:396395 forward MW:28280
orf00685	26	19	45	>orf00685 orf00685 non-heme iron-containing ferritin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 588308:588826 forward MW:19258
orf01024	26	19	45	>orf01024 orf01024 aromatic amino acid aminotransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 876473:877642 reverse MW:43172
orf01107	26	19	45	>orf01107 orf01107 hypothetical protein SP_1967 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 942054:943091 forward MW:37549
orf01221	26	19	45	>orf01221 orf01221 helicase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1039939:1042305 reverse MW:88551
orf01223	26	19	45	>orf01223 orf01223 ribonuclease HIII [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1043051:1043932 reverse MW:32377
orf02107	26	19	45	>orf02107 orf02107 ABC transporter, ATP-binding/permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1776076:1777827 forward MW:65602
orf00160	26	20	46	>orf00160 orf00160 ABC transporter, ATP-binding/permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 132470:134236 reverse MW:65703
orf00274	26	20	46	>orf00274 orf00274 homoserine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 243679:244548 forward MW:31548
orf00395	26	20	46	>orf00395 orf00395 lactose phosphotransferase system repressor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 338167:338907 reverse MW:27303
orf00733	26	20	46	>orf00733 orf00733 preprotein translocase subunit YajC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 629254:629553 reverse MW:11047
orf00804	26	20	46	>orf00804 orf00804 formamidopyrimidine-DNA glycosylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 681949:682773 forward MW:31188
orf01419	26	20	46	>orf01419 orf01419 hypothetical protein SP_0861 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1216297:1216527 forward MW:8463
orf01622	26	20	46	>orf01622 orf01622 aspartate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1388260:1389336 forward MW:38924
orf01659	26	20	46	>orf01659 orf01659 threonine synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1419727:1421211 forward MW:53752
orf01676	26	20	46	>orf01676 orf01676 competence protein CglA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1433527:1434468 forward MW:35620

orf01846	26	20	46	>orf01846 orf01846 hypothetical protein SP_1537 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1564126:1564485 forward MW:13852
orf02321	26	20	46	>orf02321 orf02321 undecaprenyl pyrophosphate phosphatase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1942408:1943253 reverse MW:31810
orf02375	26	20	46	>orf02375 orf02375 oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein AmiF [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1977013:1977939 reverse MW:34797
orf02376	26	20	46	>orf02376 orf02376 oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein AmiE [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1977950:1979017 reverse MW:39436
orf02377	26	20	46	>orf02377 orf02377 oligopeptide ABC transporter, permease protein AmiD [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1979026:1979952 reverse MW:34635
orf02378	26	20	46	>orf02378 orf02378 oligopeptide ABC transporter, permease protein AmiC [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1979952:1981448 reverse MW:55681
orf01233	26	21	47	>orf01233 orf01233 aspartate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1052632:1053996 reverse MW:50208
orf01350	26	21	47	>orf01350 orf01350 peptidase, M20/M25/M40 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1148295:1149626 reverse MW:48756
orf01351	26	21	47	>orf01351 orf01351 hypothetical protein spr1959 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1149648:1151159 reverse MW:54004
orf01880	26	21	47	>orf01880 orf01880 PTS system, IIC component, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1596402:1597877 forward MW:52996
orf02168	26	21	47	>orf02168 orf02168 O-sialoglycoprotein endopeptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1823121:1823975 forward MW:31161
orf00311	26	22	48	>orf00311 orf00311 hypothetical protein SpneCDC1_01075 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 273182:273733 reverse MW:20462
orf00454	26	22	48	>orf00454 orf00454 hypothetical protein CGSSp11BS70_10485 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 388451:389296 reverse MW:30666
orf00821	26	22	48	>orf00821 orf00821 hypothetical protein spr0889 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 695642:696484 reverse MW:30516
orf00905	26	22	48	>orf00905 orf00905 PTS system, lactose-specific IIBC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 774065:775756 forward MW:61079
orf01052	26	22	48	>orf01052 orf01052 hypothetical protein SP_0100 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 903453:903779 reverse MW:12395
orf01619	26	22	48	>orf01619 orf01619 Large conductance mechano-sensitive ion channel [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1386224:1386601 reverse MW:13616
orf01674	26	22	48	>orf01674 orf01674 alcohol dehydrogenase, zinc-containing [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1431877:1432935 forward MW:38136
orf02083	26	22	48	>orf02083 orf02083 choline transporter [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1755286:1756014 forward MW:27061
orf00275	26	23	49	>orf00275 orf00275 peptide methionine sulfoxide reductase msrA/msrB 1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 244843:245781 forward MW:35703
orf00405	26	23	49	>orf00405 orf00405 DNA polymerase III subunits gamma and tau [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 348434:350089 reverse MW:60854
orf00904	26	23	49	>orf00904 orf00904 PTS system, lactose-specific IIA component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 773748:774065 forward MW:11541
orf00961	26	23	49	>orf00961 orf00961 bifunctional methionine sulfoxide reductase A/B protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 817713:818825 reverse MW:41961
orf01530	26	23	49	>orf01530 orf01530 sugar ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1297337:1298176 reverse MW:31191
orf02037	26	23	49	>orf02037 orf02037 30S ribosomal protein S14 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1725864:1726133 forward MW:10075
orf02208	26	23	49	>orf02208 orf02208 glucuronyl hydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1855472:1856662 reverse MW:46079
orf02254	26	23	49	>orf02254 orf02254 hypothetical protein spr1694 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1894634:1895155 forward MW:19872
orf00542	26	24	50	>orf00542 orf00542 ABC transporter substrate-binding protein - manganese transport. [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 464590:465519 reverse MW:34594
orf01949	26	24	50	>orf01949 orf01949 membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1658340:1659158 forward MW:30841
orf02000	26	24	50	>orf02000 orf02000 3-Methyladenine DNA glycosylase I, constitutive [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1698612:1699175 forward MW:21466
orf02098	26	24	50	>orf02098 orf02098 xanthine permease [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1769156:1770418 reverse MW:44138
orf02206	26	24	50	>orf02206 orf02206 PTS system, IIC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1854176:1854955 reverse MW:27448
orf02211	26	24	50	>orf02211 orf02211 hypothetical protein CGSSp3BS71_06319 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1858214:1858855 forward MW:23666
orf00406	26	25	51	>orf00406 orf00406 hypothetical protein spr0768 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 350089:350586 reverse MW:18421
orf00729	26	25	51	>orf00729 orf00729 alcohol dehydrogenase, iron-containing [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 625416:628067 reverse MW:97288
orf01025	26	25	51	>orf01025 orf01025 hypothetical protein SpneCDC_06512 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 877791:878801 forward MW:36069
orf01314	26	25	51	>orf01314 orf01314 Glycerol uptake facilitator protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1112666:1113370 forward MW:24403

orf02019	26	25	51	>orf02019 orf02019 hypothetical protein spr0184 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1717253:1717759 forward MW:19060
orf02210	26	25	51	>orf02210 orf02210 gluconate 5-dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1857380:1858195 forward MW:29048
orf00061	26	26	52	>orf00061 orf00061 DNA processing protein DprA, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 53422:54270 reverse MW:31081
orf00325	26	26	52	>orf00325 orf00325 N-acetylneuraminate lyase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 279706:280017 forward MW:11140
orf00326	26	26	52	>orf00326 orf00326 hypothetical protein spr1185 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 280035:280238 forward MW:7387
orf00514	26	26	52	>orf00514 orf00514 N-acetylneuraminate lyase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 437651:437962 forward MW:11125
orf00515	26	26	52	>orf00515 orf00515 ROK family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 437980:438864 forward MW:31616
orf00543	25	26	51	>orf00543 orf00543 hypothetical protein SpneT_02000955 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 465551:466399 reverse MW:30186
orf00901	26	26	52	>orf00901 orf00901 Tagatose-6-phosphate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 770731:771660 forward MW:33416
orf01313	26	26	52	>orf01313 orf01313 alpha-glycerophosphate oxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1110770:1112596 forward MW:66808
orf01751	25	26	51	>orf01751 orf01751 oligoendopeptidase F, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1489346:1491142 reverse MW:68620
orf01950	26	26	52	>orf01950 orf01950 hypothetical protein spr0559 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1659160:1659945 forward MW:30224
orf02186	26	26	52	>orf02186 orf02186 glucan 1,6-alpha-glucosidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1836561:1838168 reverse MW:62220
orf02201	26	26	52	>orf02201 orf02201 sugar binding transcriptional regulator RegR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1850094:1851095 reverse MW:38333
orf01375	26	27	53	>orf01375 orf01375 hypothetical protein SpneT_02001056 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1183747:1184430 forward MW:24959
orf01773	26	27	53	>orf01773 orf01773 general stress protein 24, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1507663:1508271 forward MW:21816
orf02069	26	27	53	>orf02069 orf02069 hypothetical protein SpneT_02000057 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1744814:1746106 forward MW:46298
orf00145	26	28	54	>orf00145 orf00145 heat-inducible transcription repressor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 119132:120166 reverse MW:39370
orf00393	26	28	54	>orf00393 orf00393 PTS system, Fru family, IIC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 335310:337262 reverse MW:66999
orf00644	26	28	54	>orf00644 orf00644 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 557568:558269 reverse MW:25742
orf00688	26	28	54	>orf00688 orf00688 hypothetical protein SP_1570 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 589462:589632 forward MW:6517
orf00701	26	28	54	>orf00701 orf00701 hypothetical protein SP_1558 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 598918:599292 forward MW:14413
orf00742	26	28	54	>orf00742 orf00742 PTS system, membrane component, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 637934:639391 reverse MW:52547
orf00840	26	28	54	>orf00840 orf00840 glycerol dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 712870:713958 forward MW:39198
orf01103	26	28	54	>orf01103 orf01103 asparagine synthetase AsnA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 939997:940989 forward MW:37618
orf01131	26	28	54	>orf01131 orf01131 competence damage-inducible protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 963913:965169 forward MW:45047
orf01311	26	28	54	>orf01311 orf01311 glycerol kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1109221:1109568 forward MW:12882
orf01312	26	28	54	>orf01312 orf01312 glycerol kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1109553:1110728 forward MW:43517
orf01535	26	28	54	>orf01535 orf01535 N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1302299:1302997 reverse MW:25450
orf01828	26	28	54	>orf01828 orf01828 alanine racemase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1547192:1548295 forward MW:39858
orf01930	26	28	54	>orf01930 orf01930 nitroreductase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1646533:1647138 forward MW:22671
orf02067	26	28	54	>orf02067 orf02067 PTS system, IIA component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1744123:1744443 forward MW:12024
orf02068	26	28	54	>orf02068 orf02068 PTS system, IIB component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1744489:1744797 forward MW:10774
orf02099	26	28	54	>orf02099 orf02099 xanthine phosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1770418:1770999 reverse MW:20985
orf00601	26	29	55	>orf00601 orf00601 hypothetical protein SpneT_02001648 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 517233:517820 forward MW:22125
orf00735	26	29	55	>orf00735 orf00735 putative L-ascorbate 6-phosphate lactonase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 631760:632851 reverse MW:41685
orf00739	26	29	55	>orf00739 orf00739 Hexulose-6-phosphate synthase (HumpS) [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 636386:637051 reverse MW:23854

orf00740	26	29	55	>orf00740 orf00740 PTS system, IIA component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 637068:637553 reverse MW:17569
orf00741	26	29	55	>orf00741 orf00741 PTS system, IIB component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 637630:637911 reverse MW:9980
orf00949	26	29	55	>orf00949 orf00949 cytidylate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 809685:810356 reverse MW:24625
orf02225	26	29	55	>orf02225 orf02225 DNA replication initiation control protein YabA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1869497:1869814 reverse MW:12411
orf02234	26	29	55	>orf02234 orf02234 lipoprotein signal peptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1877657:1878118 reverse MW:17150
orf02329	26	29	55	>orf02329 orf02329 NAD-dependent DNA ligase LigA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1946079:1947503 forward MW:51111
orf00005	26	30	56	>orf00005 orf00005 deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 7909:8352 forward MW:15843
orf00228	26	30	56	>orf00228 orf00228 phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 202773:203651 forward MW:31201
orf00437	26	30	56	>orf00437 orf00437 oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 378444:379142 reverse MW:25249
orf00438	26	30	56	>orf00438 orf00438 hypothetical protein spr0700 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 379135:379371 reverse MW:8714
orf00493	26	30	56	>orf00493 orf00493 16S rRNA-processing protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 418447:418965 forward MW:19789
orf00526	26	30	56	>orf00526 orf00526 isoleucyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 449537:450208 forward MW:25574
orf00838	26	30	56	>orf00838 orf00838 Formate acetyltransferase 3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 709967:712165 forward MW:81771
orf00839	26	30	56	>orf00839 orf00839 fructose-6-phosphate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 712184:712852 forward MW:24431
orf00899	26	30	56	>orf00899 orf00899 galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 769749:770174 forward MW:15243
orf00948	26	30	56	>orf00948 orf00948 phnA protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 809217:809555 reverse MW:12284
orf01352	26	30	56	>orf01352 orf01352 carbamate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1151368:1152315 reverse MW:33623
orf01409	26	30	56	>orf01409 orf01409 hypothetical protein SP_0851 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1206271:1206912 reverse MW:22928
orf01413	26	30	56	>orf01413 orf01413 branched-chain amino acid aminotransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1212014:1213036 forward MW:37473
orf01437	26	30	56	>orf01437 orf01437 hypothetical protein CGSSp23BS72_04610 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1231191:1232465 forward MW:49180
orf01500	26	30	56	>orf01500 orf01500 amino acid ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1280740:1281369 reverse MW:23130
orf01501	26	30	56	>orf01501 orf01501 amino acid ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1281379:1282020 reverse MW:23967
orf01914	26	30	56	>orf01914 orf01914 fructose-bisphosphate aldolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1628533:1629414 forward MW:31402
orf02064	26	30	56	>orf02064 orf02064 glycyl-radical enzyme activating protein family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1741291:1742067 reverse MW:30016
orf02065	26	30	56	>orf02065 orf02065 DEOR-type transcriptional regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1742189:1742935 forward MW:27946
orf02136	26	30	56	>orf02136 orf02136 heat shock protein HtpX [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 1800952:1801851 reverse MW:32805
orf02308	26	30	56	>orf02308 orf02308 hypothetical protein SP_0563 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1934890:1935144 forward MW:10142
orf00213	26	31	57	>orf00213 orf00213 ribosomal protein S21 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 193084:193260 forward MW:6998
orf00359	26	31	57	>orf00359 orf00359 hypothetical protein CGSSp18BS74_02316 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 306868:307461 forward MW:22549
orf00432	26	31	57	>orf00432 orf00432 aminopeptidase N [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 374002:376548 reverse MW:95351
orf00453	26	31	57	>orf00453 orf00453 hypothetical protein SP_0741 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 387217:388392 reverse MW:42596
orf00490	26	31	57	>orf00490 orf00490 30S ribosomal protein S16 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 416521:416793 forward MW:10221
orf00491	26	31	57	>orf00491 orf00491 KH domain protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 416813:417052 forward MW:8994
orf00495	26	31	57	>orf00495 orf00495 hypothetical protein spr0688 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 419686:420024 forward MW:12937
orf00675	26	31	57	>orf00675 orf00675 ABC transporter ATP-binding protein - multiple sugar transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 580614:581744 forward MW:41834
orf00732	26	31	57	>orf00732 orf00732 nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 628779:629207 reverse MW:16525
orf00858	26	31	57	>orf00858 orf00858 30S ribosomal protein S7 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 736097:736477 forward MW:14223

orf00900	26	31	57	>orf00900 orf00900 galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 770205:770720 forward MW:18957
orf00958	26	31	57	>orf00958 orf00958 hypothetical protein CGSSp3BS71_07846 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 814557:815354 reverse MW:29996
orf00959	26	31	57	>orf00959 orf00959 Bcl-2 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 815341:816018 reverse MW:24936
orf01070	26	31	57	>orf01070 orf01070 L-asparaginase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 916003:916965 reverse MW:34869
orf01180	26	31	57	>orf01180 orf01180 hypothetical protein SP_0003 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1000929:1001123 reverse MW:7469
orf01199	26	31	57	>orf01199 orf01199 recombination protein F [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1018963:1020060 reverse MW:41916
orf01220	26	31	57	>orf01220 orf01220 trigger factor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1038608:1039891 forward MW:47342
orf01257	26	31	57	>orf01257 orf01257 transcription antitermination protein NusB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1066465:1066854 reverse MW:14119
orf01265	26	31	57	>orf01265 orf01265 50S ribosomal protein L28 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1073388:1073576 forward MW:6884
orf01266	26	31	57	>orf01266 orf01266 hypothetical protein SP_0442 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1073733:1074098 forward MW:12868
orf01420	26	31	57	>orf01420 orf01420 30S ribosomal protein S1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1216900:1218102 forward MW:43896
orf01621	26	31	57	>orf01621 orf01621 citrulline cluster-linked gene [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1387237:1387746 forward MW:18849
orf01757	26	31	57	>orf01757 orf01757 hypothetical protein CGSSp23BS72_02404 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1494502:1494972 reverse MW:18050
orf01794	26	31	57	>orf01794 orf01794 hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1519173:1520369 forward MW:44435
orf01965	26	31	57	>orf01965 orf01965 replicative DNA helicase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1668797:1670149 forward MW:50204
orf02023	26	31	57	>orf02023 orf02023 50S ribosomal protein L3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1719757:1720383 forward MW:22178
orf02025	26	31	57	>orf02025 orf02025 50S ribosomal protein L23 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1721031:1721327 forward MW:10785
orf02137	26	31	57	>orf02137 orf02137 LemA protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1801853:1802413 reverse MW:20619
orf02283	26	31	57	>orf02283 orf02283 diphosphomevalonate decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1921454:1922407 forward MW:35577
orf02450	26	31	57	>orf02450 orf02450 DNA-binding protein HU [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2041373:2041648 forward MW:9650
orf00003	26	32	58	>orf00003 orf00003 adenylosuccinate synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 5727:7055 forward MW:49263
orf00011	26	32	58	>orf00011 orf00011 hypothetical protein SP_0024 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 10317:10814 forward MW:18434
orf00031	26	32	58	>orf00031 orf00031 amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein/permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 27195:29360 forward MW:78388
orf00212	26	32	58	>orf00212 orf00212 N-acetylglucosamine-6-phosphate isomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 192237:192944 forward MW:25729
orf00253	26	32	58	>orf00253 orf00253 cytoplasmic alpha-amylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 225221:226384 forward MW:43847
orf00261	26	32	58	>orf00261 orf00261 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 231718:233001 forward MW:45738
orf00304	26	32	58	>orf00304 orf00304 translation initiation factor IF-2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 268586:271378 reverse MW:102908
orf00339	26	32	58	>orf00339 orf00339 Toxin expression - transcriptional accessory protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 290285:292414 reverse MW:78664
orf00356	26	32	58	>orf00356 orf00356 GTP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 304556:305662 forward MW:40956
orf00431	26	32	58	>orf00431 orf00431 DNA-binding response regulator CiaR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 373219:373893 reverse MW:25466
orf00487	26	32	58	>orf00487 orf00487 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 412947:414488 forward MW:58398
orf00548	26	32	58	>orf00548 orf00548 GTP pyrophosphokinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 471046:473268 forward MW:84615
orf00549	26	32	58	>orf00549 orf00549 D-tyrosyl-tRNA deacylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 473298:473741 forward MW:16213
orf00559	26	32	58	>orf00559 orf00559 amino acid ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 478601:479344 reverse MW:27367
orf00560	26	32	58	>orf00560 orf00560 amino acid ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 479344:480144 reverse MW:28931
orf00609	26	32	58	>orf00609 orf00609 hypothetical protein SP_0500 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 528662:529189 forward MW:19713
orf00610	26	32	58	>orf00610 orf00610 transcriptional regulator, MerR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 529266:529622 forward MW:13862

orf00673	26	32	58	>orf00673 orf00673 Isochorismatase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 579589:580164 forward MW:21359
orf00746	26	32	58	>orf00746 orf00746 ribonuclease P [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 642000:642371 reverse MW:14280
orf00792	26	32	58	>orf00792 orf00792 50S ribosomal protein L35 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 673035:673235 forward MW:7836
orf00834	26	32	58	>orf00834 orf00834 phosphomethylpyrimidine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 706121:707464 reverse MW:49617
orf00859	26	32	58	>orf00859 orf00859 elongation factor G [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 736902:738983 forward MW:76835
orf00872	26	32	58	>orf00872 orf00872 PTS system, mannose-specific IIC component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 749323:750126 reverse MW:27230
orf00912	26	32	58	>orf00912 orf00912 NrdH-redoxin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 782291:782509 reverse MW:8174
orf01072	26	32	58	>orf01072 orf01072 universal stress protein family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 918454:918906 reverse MW:16565
orf01096	26	32	58	>orf01096 orf01096 Pyruvate-formate lyase activating enzyme [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 936221:937015 forward MW:30124
orf01198	26	32	58	>orf01198 orf01198 inositol-5-monophosphate dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1017435:1018913 forward MW:52445
orf01227	26	32	58	>orf01227 orf01227 sodium:alanine symporter family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1047649:1048971 forward MW:46739
orf01232	26	32	58	>orf01232 orf01232 seryl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1052258:1052629 reverse MW:13672
orf01262	26	32	58	>orf01262 orf01262 peptide chain release factor 3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP195] 1070988:1072532 forward MW:58487
orf01397	26	32	58	>orf01397 orf01397 cytidine deaminase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1199214:1199603 forward MW:14230
orf01440	26	32	58	>orf01440 orf01440 uridine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1234004:1234642 forward MW:24466
orf01455	26	32	58	>orf01455 orf01455 50S ribosomal protein L33 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1244466:1244615 reverse MW:5911
orf01593	26	32	58	>orf01593 orf01593 transcriptional regulator, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1357103:1358071 forward MW:37378
orf01631	26	32	58	>orf01631 orf01631 Sua5/YciO/YrdC/YwIc family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1395169:1395771 forward MW:22269
orf01718	26	32	58	>orf01718 orf01718 bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1462566:1464113 reverse MW:56293
orf01812	26	32	58	>orf01812 orf01812 hypothetical protein SpneT_02001372 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1532906:1533601 reverse MW:25608
orf02048	26	32	58	>orf02048 orf02048 translation initiation factor IF-1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1731506:1731724 forward MW:8202
orf02050	26	32	58	>orf02050 orf02050 30S ribosomal protein S11 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1732266:1732649 forward MW:13385
orf02051	26	32	58	>orf02051 orf02051 DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1732692:1733627 forward MW:34207
orf02102	26	32	58	>orf02102 orf02102 exodeoxyribonuclease III [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1772271:1773098 reverse MW:31092
orf02151	26	32	58	>orf02151 orf02151 flavodoxin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1811241:1811684 reverse MW:16024
orf02272	26	32	58	>orf02272 orf02272 hypothetical protein SP_0373 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1911382:1912539 forward MW:43274
orf02372	26	32	58	>orf02372 orf02372 amino acid ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1975161:1975901 forward MW:27847
orf02436	26	32	58	>orf02436 orf02436 inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2031938:2032756 forward MW:31035
orf02449	26	32	58	>orf02449 orf02449 degV family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 2040427:2041266 forward MW:30667
orf00028	26	33	59	>orf00028 orf00028 excinuclease ABC, B subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 24005:25993 reverse MW:75738
orf00074	26	33	59	>orf00074 orf00074 pyrimidine regulatory protein PyrR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 67836:68357 reverse MW:19608
orf00099	26	33	59	>orf00099 orf00099 single-strand DNA-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 84269:84664 forward MW:14926
orf00136	26	33	59	>orf00136 orf00136 ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 112225:112956 reverse MW:27012
orf00157	26	33	59	>orf00157 orf00157 glucose-6-phosphate isomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 130123:131472 reverse MW:49878
orf00211	26	33	59	>orf00211 orf00211 S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 191058:192086 reverse MW:38363
orf00215	26	33	59	>orf00215 orf00215 prolipoprotein diacylglycerol transferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39] 194318:195106 forward MW:30303

orf00223	26	33	59	>orf00223 orf00223 transcriptional regulator Spx [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 199548:199853 forward MW:11752
orf00233	26	33	59	>orf00233 orf00233 phosphate transport system regulatory protein PhoU, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 207039:207692 forward MW:25028
orf00343	26	33	59	>orf00343 orf00343 hypothetical protein spr0804 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 295124:295939 forward MW:31090
orf00357	26	33	59	>orf00357 orf00357 hypothetical protein SP_1748 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 305876:306187 forward MW:11704
orf00363	26	33	59	>orf00363 orf00363 hypothetical protein CGSSp18BS74_02336 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 309187:310284 forward MW:41274
orf00394	26	33	59	>orf00394 orf00394 1-phosphofructokinase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 337259:338170 reverse MW:32669
orf00423	26	33	59	>orf00423 orf00423 DNA gyrase subunit B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 363422:365368 reverse MW:72253
orf00428	26	33	59	>orf00428 orf00428 hypothetical protein SpnC_01715 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 370505:371434 reverse MW:35587
orf00481	26	33	59	>orf00481 orf00481 dihydroorotate dehydrogenase 1A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 407887:408822 forward MW:34527
orf00485	26	33	59	>orf00485 orf00485 hypothetical protein CGSSp6BS73_01643 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 411378:412463 forward MW:41265
orf00518	26	33	59	>orf00518 orf00518 recombination protein RecR [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP195] 441999:442595 forward MW:21679
orf00524	26	33	59	>orf00524 orf00524 cell division protein FtsA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 446883:448256 forward MW:49475
orf00525	26	33	59	>orf00525 orf00525 cell division protein FtsZ [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 448273:449532 forward MW:44430
orf00584	26	33	59	>orf00584 orf00584 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, beta subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 500282:500953 forward MW:24343
orf00585	26	33	59	>orf00585 orf00585 L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 500962:501834 forward MW:30379
orf00597	26	33	59	>orf00597 orf00597 RNA methyltransferase, TrmH family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 515032:515535 reverse MW:19537
orf00634	26	33	59	>orf00634 orf00634 hypothetical protein SP_0122 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 547539:547772 forward MW:9288
orf00636	26	33	59	>orf00636 orf00636 glucose-inhibited division protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 549832:551745 reverse MW:71033
orf00651	26	33	59	>orf00651 orf00651 elongation factor Tu [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 563115:564311 forward MW:43971
orf00672	26	33	59	>orf00672 orf00672 transcriptional repressor CodY [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 578801:579589 forward MW:29756
orf00690	26	33	59	>orf00690 orf00690 GTPase EngB [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 590905:591492 forward MW:22273
orf00705	26	33	59	>orf00705 orf00705 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 602379:604250 forward MW:70898
orf00707	26	33	59	>orf00707 orf00707 cation-transporting ATPase, E1-E2 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 605881:608577 forward MW:97013
orf00772	26	33	59	>orf00772 orf00772 uridylate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 660378:661115 forward MW:26433
orf00774	26	33	59	>orf00774 orf00774 hypothetical protein spr0847 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 661702:662595 forward MW:33844
orf00775	26	33	59	>orf00775 orf00775 hypothetical protein spr0848 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 662604:662819 forward MW:8435
orf00776	26	33	59	>orf00776 orf00776 PhoH family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 662905:663873 forward MW:36314
orf00791	26	33	59	>orf00791 orf00791 translation initiation factor IF-3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 672445:673002 forward MW:21165
orf00793	26	33	59	>orf00793 orf00793 50S ribosomal protein L20 [<i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R] 673287:673646 forward MW:13693
orf00801	26	33	59	>orf00801 orf00801 hypothetical protein spr0869 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 680111:680608 forward MW:19245
orf00802	26	33	59	>orf00802 orf00802 Diacylglycerol kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 680589:680984 forward MW:14728
orf00814	26	33	59	>orf00814 orf00814 oligoendopeptidase F [<i>Streptococcus pneumoniae</i> MLV-016] 689793:691595 forward MW:69910
orf00815	26	33	59	>orf00815 orf00815 O-methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 691633:692310 forward MW:25506
orf00832	26	33	59	>orf00832 orf00832 proline dipeptidase PepQ [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 704131:705213 reverse MW:40273
orf00833	26	33	59	>orf00833 orf00833 hypothetical protein SpnC_05280 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 705339:706121 reverse MW:29223
orf00854	26	33	59	>orf00854 orf00854 D-fructose-6-phosphate amidotransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 728284:730092 forward MW:65646
orf00857	26	33	59	>orf00857 orf00857 30S ribosomal protein S12 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 735574:735987 forward MW:15143

orf00868	26	33	59	>orf00868 orf00868 ribosomal small subunit pseudouridine synthase A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 746058:746780 forward MW:27436
orf00871	26	33	59	>orf00871 orf00871 PTS system, mannose-specific IID component [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 748388:749299 reverse MW:33786
orf00887	26	33	59	>orf00887 orf00887 30S ribosomal protein S9 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 760886:761278 forward MW:14234
orf00911	26	33	59	>orf00911 orf00911 ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 780051:782210 reverse MW:81593
orf00920	26	33	59	>orf00920 orf00920 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 788964:789863 reverse MW:33249
orf00921	26	33	59	>orf00921 orf00921 NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 789885:790901 reverse MW:36777
orf00936	26	33	59	>orf00936 orf00936 phosphopantothoenylcysteine decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 801880:802431 forward MW:19866
orf01022	26	33	59	>orf01022 orf01022 DNA repair protein RecO [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 875706:876476 reverse MW:29787
orf01088	26	33	59	>orf01088 orf01088 ribosome-associated GTPase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 929325:930203 forward MW:32993
orf01091	26	33	59	>orf01091 orf01091 hypothetical protein CGSSp11BS70_11416 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 931497:932753 forward MW:47879
orf01109	26	33	59	>orf01109 orf01109 UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 943403:944686 forward MW:45868
orf01151	26	33	59	>orf01151 orf01151 Maltodextrin phosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 980615:982873 forward MW:85184
orf01169	26	33	59	>orf01169 orf01169 hypoxanthine phosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 991688:992230 reverse MW:20154
orf01177	26	33	59	>orf01177 orf01177 transcription-repair coupling factor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 995580:999089 reverse MW:134815
orf01196	26	33	59	>orf01196 orf01196 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1014430:1016052 reverse MW:60871
orf01204	26	33	59	>orf01204 orf01204 CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1023994:1024539 forward MW:20057
orf01205	26	33	59	>orf01205 orf01205 ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1024536:1025363 forward MW:31102
orf01236	26	33	59	>orf01236 orf01236 transcriptional regulator, MarR family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1055244:1055678 forward MW:16735
orf01250	26	33	59	>orf01250 orf01250 acetyl-CoA carboxylase subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1063287:1064153 forward MW:31786
orf01258	26	33	59	>orf01258 orf01258 elongation factor P [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1066876:1067436 reverse MW:20600
orf01267	26	33	59	>orf01267 orf01267 hypothetical protein CGSSp6BS73_11791 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1074101:1075768 forward MW:60130
orf01353	26	33	59	>orf01353 orf01353 ornithine carbamoyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1152480:1153496 reverse MW:37911
orf01381	26	33	59	>orf01381 orf01381 ribose-5-phosphate isomerase A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1187471:1188154 forward MW:24792
orf01398	26	33	59	>orf01398 orf01398 probable membrane lipoprotein TmpC precursor [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1199694:1200746 forward MW:36756
orf01403	26	33	59	>orf01403 orf01403 sugar ABC transporter, permease protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1203479:1204435 forward MW:33749
orf01423	26	33	59	>orf01423 orf01423 DNA-binding response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1219730:1220434 forward MW:26816
orf01424	26	33	59	>orf01424 orf01424 Histidine kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1220427:1221776 forward MW:51713
orf01429	26	33	59	>orf01429 orf01429 L-lactate dehydrogenase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1224256:1225242 reverse MW:35369
orf01448	26	33	59	>orf01448 orf01448 DNA repair protein RecN [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1238411:1240078 forward MW:62866
orf01456	26	33	59	>orf01456 orf01456 50S ribosomal protein L32 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1244631:1244813 reverse MW:6771
orf01579	26	33	59	>orf01579 orf01579 orotate phosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1344370:1345002 reverse MW:22857
orf01580	26	33	59	>orf01580 orf01580 orotidine 5'-phosphate decarboxylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 1345036:1345737 reverse MW:25437
orf01592	26	33	59	>orf01592 orf01592 hypothetical protein spr0594 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1356830:1357099 reverse MW:10735
orf01597	26	33	59	>orf01597 orf01597 GTP-binding protein HflX [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1360461:1361699 reverse MW:46743
orf01601	26	33	59	>orf01601 orf01601 thymidylate synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1362915:1363754 reverse MW:32554
orf01608	26	33	59	>orf01608 orf01608 hypothetical protein CGSSp18BS74_09435 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1374102:1374665 reverse MW:20222
orf01634	26	33	59	>orf01634 orf01634 hypothetical protein CGSSp9BS68_03993 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1397530:1398504 forward MW:37236

orf01671	26	33	59	>orf01671 orf01671 queuine tRNA-ribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1427350:1428492 forward MW:43120
orf01710	26	33	59	>orf01710 orf01710 adenylosuccinate lyase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1457615:1458913 reverse MW:49591
orf01720	26	33	59	>orf01720 orf01720 phosphoribosylglycinamide formyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1464731:1465276 reverse MW:20276
orf01723	26	33	59	>orf01723 orf01723 amidophosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1466332:1467774 reverse MW:52834
orf01725	26	33	59	>orf01725 orf01725 phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1471794:1472501 reverse MW:26974
orf01815	26	33	59	>orf01815 orf01815 hypothetical protein SP_1713 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1534111:1534584 forward MW:18379
orf01842	26	33	59	>orf01842 orf01842 single-strand DNA-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1561688:1562158 forward MW:17351
orf01844	26	33	59	>orf01844 orf01844 30S ribosomal protein S18 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1562190:1562429 forward MW:9203
orf01845	26	33	59	>orf01845 orf01845 Cof family protein/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1562724:1564124 forward MW:52116
orf01873	26	33	59	>orf01873 orf01873 arginyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1591445:1593136 forward MW:63444
orf01922	26	33	59	>orf01922 orf01922 metallo-beta-lactamase superfamily protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1636815:1638476 forward MW:61152
orf01943	26	33	59	>orf01943 orf01943 50S ribosomal protein L11 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1653767:1654192 forward MW:14800
orf01973	26	33	59	>orf01973 orf01973 chaperone ClpB 1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 1675243:1677675 forward MW:90164
orf02010	26	33	59	>orf02010 orf02010 hypothetical protein SP_0192 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1708198:1708464 forward MW:10227
orf02012	26	33	59	>orf02012 orf02012 hypothetical protein SP_0194 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1708903:1709208 forward MW:11758
orf02017	26	33	59	>orf02017 orf02017 anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1714850:1717057 forward MW:83890
orf02020	26	33	59	>orf02020 orf02020 anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1717752:1718342 forward MW:22619
orf02026	26	33	59	>orf02026 orf02026 50S ribosomal protein L2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1721345:1722178 forward MW:29920
orf02027	26	33	59	>orf02027 orf02027 30S ribosomal protein S19 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1722282:1722563 forward MW:10750
orf02035	26	33	59	>orf02035 orf02035 50S ribosomal protein L24 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1724975:1725280 forward MW:10991
orf02046	26	33	59	>orf02046 orf02046 preprotein translocase subunit Sec Y [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1729290:1730600 forward MW:47353
orf02049	26	33	59	>orf02049 orf02049 30S ribosomal protein S13 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1731883:1732248 forward MW:13421
orf02052	26	33	59	>orf02052 orf02052 50S ribosomal protein L17 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1733639:1734025 forward MW:14505
orf02128	26	33	59	>orf02128 orf02128 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1794236:1795243 forward MW:35855
orf02147	26	33	59	>orf02147 orf02147 50S ribosomal protein L19 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1809699:1810046 reverse MW:13136
orf02152	26	33	59	>orf02152 orf02152 hypothetical protein spr1176 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1811788:1812723 forward MW:34966
orf02171	26	33	59	>orf02171 orf02171 ABC transporter, permease protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1826504:1827196 forward MW:24520
orf02224	26	33	59	>orf02224 orf02224 hypothetical protein CGSSp11BS70_09425 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1868625:1869494 reverse MW:32495
orf02251	26	33	59	>orf02251 orf02251 glutamate racemase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1892896:1893690 forward MW:29138
orf02258	26	33	59	>orf02258 orf02258 segregation and condensation protein B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1897091:1897660 forward MW:21038
orf02403	26	33	59	>orf02403 orf02403 cell division protein FtsW, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 2002231:2003460 forward MW:45465
orf02429	26	33	59	>orf02429 orf02429 redox-sensing transcriptional repressor Rex [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2027093:2027734 reverse MW:24165
orf02433	26	33	59	>orf02433 orf02433 ribose-phosphate pyrophosphokinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2029517:2030476 reverse MW:35125
orf02435	26	33	59	>orf02435 orf02435 hypothetical protein SP_1097 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2031283:2031954 forward MW:26183
orf00013	26	34	60	>orf00013 orf00013 ribose-phosphate pyrophosphokinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 11799:12767 forward MW:35451
orf00032	26	34	60	>orf00032 orf00032 ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 29360:30100 forward MW:27351
orf00072	26	34	60	>orf00072 orf00072 carbamoyl phosphate synthase small subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 65765:66844 reverse MW:39863

orf00073	26	34	60	>orf00073 orf00073 aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 66894:67817 reverse MW:34690
orf00106	26	34	60	>orf00106 orf00106 hypothetical protein SP_1903 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 88189:88722 reverse MW:21338
orf00137	26	34	60	>orf00137 orf00137 HIT family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 113024:113434 forward MW:15056
orf00141	26	34	60	>orf00141 orf00141 dnaJ protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 114394:115530 reverse MW:40502
orf00142	26	34	60	>orf00142 orf00142 molecular chaperone DnaK [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 116289:118112 reverse MW:64812
orf00143	26	34	60	>orf00143 orf00143 heat shock protein GrpE [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 118581:119105 reverse MW:19969
orf00168	26	34	60	>orf00168 orf00168 hypothetical protein SpneT_02000522 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 138688:139356 forward MW:24610
orf00169	26	34	60	>orf00169 orf00169 mutator MutT protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 139366:139830 forward MW:17812
orf00181	26	34	60	>orf00181 orf00181 ribosomal biogenesis GTPase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 153011:153862 reverse MW:32159
orf00201	26	34	60	>orf00201 orf00201 peptidase, U32 family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 181486:182211 forward MW:27493
orf00207	26	34	60	>orf00207 orf00207 nicotinate phosphoribosyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 185357:186817 forward MW:55133
orf00208	26	34	60	>orf00208 orf00208 NAD+ synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 186814:187638 forward MW:30122
orf00218	26	34	60	>orf00218 orf00218 coproporphyrinogen III oxidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 195979:197109 forward MW:42749
orf00221	26	34	60	>orf00221 orf00221 hydrolase, haloacid dehalogenase-like family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 197862:198635 forward MW:28150
orf00230	26	34	60	>orf00230 orf00230 phosphate ABC transporter, permease protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 204558:205442 forward MW:31566
orf00231	26	34	60	>orf00231 orf00231 phosphate ABC transporter, ATP-binding protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 205453:206256 forward MW:30363
orf00232	26	34	60	>orf00232 orf00232 phosphate ABC transporter, ATP-binding protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 206269:207027 forward MW:27954
orf00242	26	34	60	>orf00242 orf00242 UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 211702:212607 forward MW:32956
orf00244	26	34	60	>orf00244 orf00244 ABC transporter membrane-spanning permease - spermidine/putrescine transport [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 213906:214712 forward MW:30659
orf00245	26	34	60	>orf00245 orf00245 spermidine/putrescine ABC transporter, permease protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 214709:215482 forward MW:28998
orf00246	26	34	60	>orf00246 orf00246 spermidine/putrescine ABC transporter, spermidine/putrescine-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 215479:216549 forward MW:41029
orf00280	26	34	60	>orf00280 orf00280 50S ribosomal protein L10 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 251124:251624 forward MW:17479
orf00301	26	34	60	>orf00301 orf00301 ribosome-binding factor A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 267985:268335 reverse MW:13310
orf00306	26	34	60	>orf00306 orf00306 hypothetical protein SP_0555 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 271395:271694 reverse MW:10914
orf00307	26	34	60	>orf00307 orf00307 hypothetical protein SP_0554 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 271687:271980 reverse MW:11240
orf00309	26	34	60	>orf00309 orf00309 transcription elongation factor NusA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 272002:273126 reverse MW:42322
orf00312	26	34	60	>orf00312 orf00312 tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 273788:274423 reverse MW:24340
orf00342	26	34	60	>orf00342 orf00342 hypothetical protein spr0805 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 294222:295127 forward MW:33320
orf00361	26	34	60	>orf00361 orf00361 hypothetical protein spr1589 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 307975:308328 forward MW:12853
orf00368	26	34	60	>orf00368 orf00368 guanylate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 312764:313390 forward MW:23686
orf00371	26	34	60	>orf00371 orf00371 methionyl-tRNA formyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 316204:317139 forward MW:33987
orf00372	26	34	60	>orf00372 orf00372 rRNA methylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 317132:318445 forward MW:49013
orf00387	26	34	60	>orf00387 orf00387 thiamine biosynthesis protein ThiI [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 329839:331053 reverse MW:45141
orf00399	26	34	60	>orf00399 orf00399 NifU family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 344338:344778 reverse MW:16015
orf00401	26	34	60	>orf00401 orf00401 FeS assembly protein SufD [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 346002:347264 reverse MW:46354
orf00408	26	34	60	>orf00408 orf00408 peptide deformylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 351609:352220 reverse MW:22692

orf00418	26	34	60	>orf00418 orf00418 transcriptional regulator, GntR family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 357973:358671 reverse MW:26856
orf00419	26	34	60	>orf00419 orf00419 bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 358813:360375 forward MW:57473
orf00447	26	34	60	>orf00447 orf00447 mannose-6-phosphate isomerase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 383445:384389 forward MW:35222
orf00473	26	34	60	>orf00473 orf00473 cell division ATP-binding protein FtsE [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 399341:400033 forward MW:25769
orf00480	26	34	60	>orf00480 orf00480 S-adenosylmethionine synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 406144:407334 forward MW:43201
orf00497	26	34	60	>orf00497 orf00497 hypothetical protein SpneT_02000469 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 420472:420687 forward MW:8122
orf00519	26	34	60	>orf00519 orf00519 D-alanyl-alanine synthetase A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP195] 442771:443814 forward MW:38639
orf00520	26	34	60	>orf00520 orf00520 UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 443898:445271 forward MW:50303
orf00537	26	34	60	>orf00537 orf00537 phosphoglyceromutase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 457063:457755 forward MW:26051
orf00545	26	34	60	>orf00545 orf00545 endopeptidase O [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 467409:469301 forward MW:71880
orf00565	26	34	60	>orf00565 orf00565 hemolysin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 482254:482901 forward MW:24202
orf00573	26	34	60	>orf00573 orf00573 hypothetical protein SP_1473 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 489172:489429 reverse MW:9873
orf00574	26	34	60	>orf00574 orf00574 glycyl-tRNA synthetase subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 489471:491507 reverse MW:75528
orf00608	26	34	60	>orf00608 orf00608 phosphoglycerate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 527330:528526 forward MW:41953
orf00611	26	34	60	>orf00611 orf00611 glutamine synthetase, type I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 529659:531005 forward MW:50322
orf00629	26	34	60	>orf00629 orf00629 O-sialoglycoprotein endopeptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 544087:545097 reverse MW:36155
orf00635	26	34	60	>orf00635 orf00635 metallo-beta-lactamase superfamily protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 547774:549453 forward MW:61010
orf00642	26	34	60	>orf00642 orf00642 methionyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 554186:556183 reverse MW:75593
orf00671	26	34	60	>orf00671 orf00671 ATP-dependent RNA helicase, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 576962:578536 forward MW:58827
orf00693	26	34	60	>orf00693 orf00693 hypothetical protein SpneC_04402 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 591935:592825 forward MW:33713
orf00694	26	34	60	>orf00694 orf00694 hypothetical protein SP_1565 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 592822:593799 forward MW:36087
orf00695	26	34	60	>orf00695 orf00695 hypothetical protein spr1422 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 593796:594707 forward MW:34122
orf00700	26	34	60	>orf00700 orf00700 phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 597492:598844 forward MW:48124
orf00803	26	34	60	>orf00803 orf00803 GTP-binding protein Era [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 681001:681900 forward MW:34010
orf00808	26	34	60	>orf00808 orf00808 preprotein translocase subunit SecG [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 684753:684986 forward MW:8550
orf00809	26	34	60	>orf00809 orf00809 preprotein translocase subunit SecE [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 685088:687442 forward MW:89215
orf00810	26	34	60	>orf00810 orf00810 SsrA-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 687405:687872 forward MW:17747
orf00820	26	34	60	>orf00820 orf00820 Regulatory protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 695160:695642 reverse MW:17586
orf00823	26	34	60	>orf00823 orf00823 UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 697511:698890 forward MW:49458
orf00826	26	34	60	>orf00826 orf00826 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 699788:700480 forward MW:24651
orf00827	26	34	60	>orf00827 orf00827 hypothetical protein SP_0992 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 700569:701048 forward MW:18510
orf00841	26	34	60	>orf00841 orf00841 leucyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 714413:716914 forward MW:94392
orf00848	26	34	60	>orf00848 orf00848 undecaprenyl diphosphate synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 721897:722655 forward MW:28705
orf00850	26	34	60	>orf00850 orf00850 Determinant for enhanced expression of pheromone [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 723489:724748 forward MW:45865
orf00852	26	34	60	>orf00852 orf00852 prolyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 724761:726614 forward MW:68594
orf00910	26	34	60	>orf00910 orf00910 ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 778901:779863 reverse MW:36962

orf00943	26	34	60	>orf00943 orf00943 tRNA pseudouridine synthase A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 806128:806877 reverse MW:28380
orf01016	26	34	60	>orf01016 orf01016 formate acetyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 870635:872959 reverse MW:87779
orf01021	26	34	60	>orf01021 orf01021 fatty acid/phospholipid synthesis protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 874717:875709 reverse MW:34946
orf01028	26	34	60	>orf01028 orf01028 DNA polymerase I [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP195] 879561:882194 reverse MW:99146
orf01042	26	34	60	>orf01042 orf01042 30S ribosomal protein S4 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 893080:893691 forward MW:23029
orf01068	26	34	60	>orf01068 orf01068 catabolite control protein A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 914562:915572 forward MW:37073
orf01078	26	34	60	>orf01078 orf01078 hydrolase, TatD family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1873-00] 922244:923017 forward MW:28891
orf01079	26	34	60	>orf01079 orf01079 primase-related protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 923017:923577 forward MW:21505
orf01092	26	34	60	>orf01092 orf01092 hypothetical protein SpneT_02000037 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 932743:933684 forward MW:35786
orf01099	26	34	60	>orf01099 orf01099 Acylphosphate phosphohydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 938094:938372 reverse MW:10195
orf01104	26	34	60	>orf01104 orf01104 N6-adenine-specific methylase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 941054:941593 forward MW:19872
orf01112	26	34	60	>orf01112 orf01112 CBS domain membrane protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 945959:947290 forward MW:49622
orf01117	26	34	60	>orf01117 orf01117 DNA-directed RNA polymerase subunit beta' [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 951618:955295 forward MW:137016
orf01128	26	34	60	>orf01128 orf01128 conserved hypothetical protein TIGR00150 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 961853:962296 forward MW:16401
orf01156	26	34	60	>orf01156 orf01156 histidyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 985310:986599 forward MW:48753
orf01178	26	34	60	>orf01178 orf01178 peptidyl-tRNA hydrolase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 999090:999659 reverse MW:21390
orf01179	26	34	60	>orf01179 orf01179 translation-associated GTPase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 999730:1000845 reverse MW:41171
orf01181	26	34	60	>orf01181 orf01181 DNA polymerase III subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1001188:1002324 reverse MW:42073
orf01207	26	34	60	>orf01207 orf01207 hypothetical protein SP_2219 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1026180:1026974 forward MW:29478
orf01211	26	34	60	>orf01211 orf01211 ribosomal protein S2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1029841:1030620 forward MW:28841
orf01226	26	34	60	>orf01226 orf01226 MutS2 family protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1044970:1047306 forward MW:87654
orf01231	26	34	60	>orf01231 orf01231 seryl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1050770:1052044 reverse MW:47664
orf01235	26	34	60	>orf01235 orf01235 enoyl-CoA hydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1054365:1055150 forward MW:28723
orf01238	26	34	60	>orf01238 orf01238 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1055678:1056652 forward MW:34903
orf01239	26	34	60	>orf01239 orf01239 acyl carrier protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1056712:1056936 forward MW:8268
orf01242	26	34	60	>orf01242 orf01242 acyl-carrier-protein S-malonyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1058022:1058942 forward MW:33091
orf01243	26	34	60	>orf01243 orf01243 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1058976:1059707 forward MW:25756
orf01244	26	34	60	>orf01244 orf01244 gi 30750044 pdb 1OX0 A Chain A, The Crystal Structure Of Beta-Ketoacyl-[acyl Carrier Protein] ;; Synthase Ii From <i>Streptococcus pneumoniae</i> 1059729:1060964 forward MW:43932
orf01248	26	34	60	>orf01248 orf01248 (3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1061449:1061871 forward MW:15286
orf01251	26	34	60	>orf01251 orf01251 acetyl-CoA carboxylase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1064150:1064917 forward MW:28233
orf01259	26	34	60	>orf01259 orf01259 aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1067565:1069007 reverse MW:53733
orf01260	26	34	60	>orf01260 orf01260 aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1069007:1070473 reverse MW:52090
orf01261	26	34	60	>orf01261 orf01261 aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1070473:1070775 reverse MW:11044
orf01308	26	34	60	>orf01308 orf01308 hypothetical protein spr1994 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1105631:1106611 reverse MW:35781
orf01309	26	34	60	>orf01309 orf01309 Hsp33-like chaperonin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1106598:1107470 reverse MW:31663
orf01325	26	34	60	>orf01325 orf01325 D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1121836:1122075 forward MW:8980

orf01330	26	34	60	>orf01330 orf01330 zinc ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1123931:1124635 forward MW:26528
orf01368	26	34	60	>orf01368 orf01368 tyrosyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1170449:1171705 reverse MW:47476
orf01373	26	34	60	>orf01373 orf01373 ATP dependent protease [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1180839:1183097 reverse MW:83811
orf01374	26	34	60	>orf01374 orf01374 hypothetical protein SP_0822 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1183326:1183556 reverse MW:8837
orf01377	26	34	60	>orf01377 orf01377 amino acid ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1184430:1185164 forward MW:27078
orf01378	26	34	60	>orf01378 orf01378 bifunctional protein FolD [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 1185297:1186175 forward MW:31555
orf01382	26	34	60	>orf01382 orf01382 phosphopentomutase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1188168:1189379 forward MW:44077
orf01385	26	34	60	>orf01385 orf01385 purine nucleoside phosphorylase I, inosine and guanosine-specific [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6] 1189925:1190734 forward MW:29061
orf01391	26	34	60	>orf01391 orf01391 30S Ribosomal protein subunit S20 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1194695:1194931 reverse MW:8525
orf01394	26	34	60	>orf01394 orf01394 pantothenate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1196692:1197273 forward MW:21374
orf01402	26	34	60	>orf01402 orf01402 sugar ABC transporter, permease protein, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1202418:1203476 forward MW:37419
orf01412	26	34	60	>orf01412 orf01412 DNA topoisomerase IV [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 1209447:1211882 forward MW:91745
orf01425	26	34	60	>orf01425 orf01425 vicX protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1221778:1222587 forward MW:29917
orf01430	26	34	60	>orf01430 orf01430 DNA gyrase subunit A [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1225436:1227904 forward MW:92054
orf01443	26	34	60	>orf01443 orf01443 exodeoxyribonuclease VII small subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1236088:1236300 forward MW:7849
orf01446	26	34	60	>orf01446 orf01446 hemolysin A, putative [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1237165:1237980 forward MW:29797
orf01497	26	34	60	>orf01497 orf01497 phosphoglucomutase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1277437:1279155 forward MW:62683
orf01506	26	34	60	>orf01506 orf01506 F0F1 ATP synthase subunit epsilon [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1285753:1286172 reverse MW:15638
orf01507	26	34	60	>orf01507 orf01507 F0F1 ATP synthase subunit beta [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1286183:1287589 reverse MW:50934
orf01509	26	34	60	>orf01509 orf01509 F0F1 ATP synthase subunit alpha [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP9-BS68] 1288569:1290074 reverse MW:54676
orf01546	26	34	60	>orf01546 orf01546 hypothetical protein SP_2113 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1316760:1317701 forward MW:35396
orf01568	26	34	60	>orf01568 orf01568 lysyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1335816:1337306 reverse MW:56682
orf01583	26	34	60	>orf01583 orf01583 UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1348239:1349591 reverse MW:48422
orf01595	26	34	60	>orf01595 orf01595 ribonuclease Z [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1358901:1359830 reverse MW:34198
orf01598	26	34	60	>orf01598 orf01598 tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1361692:1362576 reverse MW:33384
orf01602	26	34	60	>orf01602 orf01602 glucokinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1363851:1364810 reverse MW:33421
orf01626	26	34	60	>orf01626 orf01626 hypothetical protein SpneT_02000560 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1391884:1392066 reverse MW:6746
orf01633	26	34	60	>orf01633 orf01633 serine hydroxymethyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1396266:1397522 forward MW:45286
orf01637	26	34	60	>orf01637 orf01637 23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase RumA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1400240:1401871 forward MW:61875
orf01712	26	34	60	>orf01712 orf01712 phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1459213:1460304 reverse MW:39298
orf01713	26	34	60	>orf01713 orf01713 phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1460291:1460779 reverse MW:16945
orf01716	26	34	60	>orf01716 orf01716 phosphoribosylamine--glycine ligase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC0288-04] 1461182:1462444 reverse MW:45342
orf01721	26	34	60	>orf01721 orf01721 phosphoribosylaminoimidazole synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP18-BS74] 1465273:1466295 reverse MW:36502
orf01724	26	34	60	>orf01724 orf01724 phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75] 1467867:1471592 reverse MW:135592
orf01746	26	34	60	>orf01746 orf01746 thioredoxin [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1486120:1486434 forward MW:11449
orf01752	26	34	60	>orf01752 orf01752 nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69] 1491153:1491896 reverse MW:27183
orf01763	26	34	60	>orf01763 orf01763 recombination factor protein RarA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1496920:1498191 forward MW:46988

orf01803	26	34	60	>orf01803 orf01803 fructokinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC1087-00] 1526488:1527375 forward MW:31949
orf01819	26	34	60	>orf01819 orf01819 GTP-binding protein EngA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1537375:1538685 forward MW:49082
orf01824	26	34	60	>orf01824 orf01824 preprotein translocase, SecA subunit [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1542137:1544650 forward MW:95045
orf01863	26	34	60	>orf01863 orf01863 UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1581630:1582964 forward MW:49904
orf01867	26	34	60	>orf01867 orf01867 transcription elongation factor GreA [<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39] 1585736:1586218 forward MW:17543
orf01888	26	34	60	>orf01888 orf01888 hypothetical protein SpneT_02001132 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1604665:1605711 forward MW:39102
orf01899	26	34	60	>orf01899 orf01899 serine acetyltransferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1617117:1617734 forward MW:22485
orf01901	26	34	60	>orf01901 orf01901 cysteinyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1618717:1620060 forward MW:50995
orf01902	26	34	60	>orf01902 orf01902 hypothetical protein SP_0592 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1620053:1620439 forward MW:14636
orf01933	26	34	60	>orf01933 orf01933 hypothetical protein CGSSp6BS73_02415 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73] 1648605:1649183 forward MW:22105
orf01944	26	34	60	>orf01944 orf01944 50S ribosomal protein L1 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1654400:1655089 forward MW:24495
orf01957	26	34	60	>orf01957 orf01957 cysteine synthase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1661716:1662636 reverse MW:31857
orf01962	26	34	60	>orf01962 orf01962 ribosomal subunit interface protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1665648:1666196 forward MW:21123
orf01999	26	34	60	>orf01999 orf01999 Holliday junction DNA helicase motor protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1698009:1698602 forward MW:21650
orf02007	26	34	60	>orf02007 orf02007 transcriptional regulator Spx [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1707078:1707476 forward MW:14890
orf02029	26	34	60	>orf02029 orf02029 50S ribosomal protein L22 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1722575:1722919 forward MW:12200
orf02030	26	34	60	>orf02030 orf02030 30S ribosomal protein S3 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1722932:1723585 forward MW:24046
orf02031	26	34	60	>orf02031 orf02031 50S ribosomal protein L16 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1723589:1724002 forward MW:15436
orf02032	26	34	60	>orf02032 orf02032 50S ribosomal protein L29 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1724012:1724218 forward MW:7987
orf02033	26	34	60	>orf02033 orf02033 30S ribosomal protein S17 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1724243:1724503 forward MW:10010
orf02034	26	34	60	>orf02034 orf02034 50S ribosomal protein L14 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1724529:1724897 forward MW:13006
orf02036	26	34	60	>orf02036 orf02036 50S ribosomal protein L5 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1725304:1725846 forward MW:19774
orf02039	26	34	60	>orf02039 orf02039 30S ribosomal protein S8 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1726418:1726816 forward MW:14754
orf02040	26	34	60	>orf02040 orf02040 50S ribosomal protein L6 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1727008:1727544 forward MW:19441
orf02042	26	34	60	>orf02042 orf02042 hypothetical protein SpneT_02000082 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1727628:1727984 forward MW:12866
orf02043	26	34	60	>orf02043 orf02043 30S ribosomal protein S5 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1728002:1728496 forward MW:17057
orf02044	26	34	60	>orf02044 orf02044 50S ribosomal protein L30 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1728510:1728692 forward MW:6398
orf02045	26	34	60	>orf02045 orf02045 50S ribosomal protein L15 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1728837:1729277 forward MW:15446
orf02047	26	34	60	>orf02047 orf02047 hypothetical protein SpneT_02000077 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1730751:1731389 forward MW:23735
orf02134	26	34	60	>orf02134 orf02134 hypothetical protein spr0720 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1799796:1800095 reverse MW:11259
orf02138	26	34	60	>orf02138 orf02138 glucose-inhibited division protein B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1802507:1803220 forward MW:27198
orf02141	26	34	60	>orf02141 orf02141 signal recognition particle protein [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1804952:1806523 reverse MW:57758
orf02143	26	34	60	>orf02143 orf02143 hypothetical protein SP_1288 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1806535:1806867 reverse MW:13348
orf02170	26	34	60	>orf02170 orf02170 ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1825441:1826502 forward MW:38720
orf02188	26	34	60	>orf02188 orf02188 S-ribosylhomocysteinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1839900:1840382 forward MW:17923
orf02192	26	34	60	>orf02192 orf02192 gi 148996751 ref ZP_01824469.1 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70] 1843950:1844930 reverse MW:35966

<i>orf02195</i>	26	34	60	>orf02195 orf02195 S-adenosyl-methyltransferase MraW [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1847517:1848467 reverse MW:36000
<i>orf02227</i>	26	34	60	>orf02227 orf02227 thymidylate kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06] 1870741:1871379 reverse MW:23352
<i>orf02235</i>	26	34	60	>orf02235 orf02235 Regulatory function on capsule expression in group B streptococci [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 1878115:1879023 reverse MW:34907
<i>orf02259</i>	26	34	60	>orf02259 orf02259 ribosomal large subunit pseudouridine synthase B [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1897647:1898369 forward MW:27127
<i>orf02268</i>	26	34	60	>orf02268 orf02268 Holliday junction-specific endonuclease [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1909308:1909904 reverse MW:23130
<i>orf02289</i>	26	34	60	>orf02289 orf02289 DNA-binding response regulator [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1926177:1926809 forward MW:23553
<i>orf02315</i>	26	34	60	>orf02315 orf02315 valyl-tRNA synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 1937525:1940176 forward MW:100808
<i>orf02338</i>	26	34	60	>orf02338 orf02338 phosphopyruvate hydratase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 1955933:1957237 forward MW:47103
<i>orf02409</i>	26	34	60	>orf02409 orf02409 RNA polymerase sigma factor RpoD [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2011136:2012245 forward MW:42031
<i>orf02415</i>	26	34	60	>orf02415 orf02415 GTP-binding protein, GTP1/Obg family [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72] 2015557:2016861 forward MW:48145
<i>orf02420</i>	26	34	60	>orf02420 orf02420 methionine aminopeptidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2021228:2022088 forward MW:31650
<i>orf02431</i>	26	34	60	>orf02431 orf02431 hypothetical protein SP_1093 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4] 2028040:2028387 reverse MW:13526
<i>orf02437</i>	26	34	60	>orf02437 orf02437 inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71] 2032753:2033649 forward MW:33967
<i>orf02440</i>	26	34	60	>orf02440 orf02440 hypothetical protein spr1010 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6] 2035008:2035307 reverse MW:10935

A coluna 2 - “número de genomas de *S. pneumoniae*” temos o número de genomas analisados para esta espécie, ou seja, 26; na coluna 3 - “número de genomas de *Streptococcus* sp.” temos o número de genomas totais analisados para outras espécies que não pneumococos, os quais foram utilizados para a montagem dos bancos de dados de proteínas estreptocócicas (máximo de 34 genomas), totalizando 60 genomas (coluna 4).

Os genes sublinhados foram aqueles encontradas apenas em pneumococos, utilizando os parâmetros de 60% de identidade e 70% de “overlap”. Os demais genes descritos na tabela mas não sublinhados foram encontrados em pneumococos (coluna 2) mas também em outros genomas de *Streptococcus* sp. (coluna 3).

Anexo 9: Programas utilizados para as análises “in silico” das proteínas pneumocócicas e número de proteínas classificadas dentro de cada uma das características avaliadas pelos programas

Características das proteínas analisadas	Programas						
	Psortb	PredLipo	Phobius	PhobiusSignal	SOSUI+SOSUISignal	TMHMM	SignalP
citoplasmática	9	83	8	NA ¹	NA	3	NA
não citoplasmática ou extracelular	7	NA	73	NA	NA	76	NA
presença de região transmembrana	66	53	70	NA	72	72	NA
parede celular	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
desconhecida	67	NA	NA	NA	NA	NA	NA
solúvel	NA	NA	NA	NA	79	NA	NA
presença de peptídeo sinal	NA	11	NA	30	30	NA	41
ausência de peptídeo sinal	NA	NA	NA	121	121	NA	110
lipoproteína	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA
Total de proteínas analisadas	151	151	151	151	NA	151	151

¹NA – não se aplica

Anexo 10: Análises “in silico” das 159 proteínas ortólogas presentes em pneumococos

Gene em SPN5 617/00	Peptídeo sinal	Localização	Peptídeo sinal	Localização	Pred-Lipo	Phobius	Phobius peptídeo sinal	SOSUI	SOSUISignal	TMHMM	SignalP	Anotação
<u>00002</u>	N ¹	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp3BS71_07921
<u>00026</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	phosphopantothoenylcysteine decarboxylase
<u>00062</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	S ²	solúvel	S	externa	N	Homologous to LicC, which regulates expression of LPS epitopes in <i>H. influenzae</i>
<u>00063</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	não citoplasmática	N	membrana	N	membrana	N	protein LicB
<u>00064</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	choline kinase
<u>00065</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	alcohol dehydrogenase, zinc-containing
<u>00067</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase
<u>00068</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	polysaccharide biosynthesis protein, putative
<u>00080</u>	N	membrana	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	ABC transporter, ATP-binding protein
<u>00083</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_1925
<u>00085</u>	N	citoplasmática	N	extracelular	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	pneumolysin
<u>00090</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	N	hypothetical protein SP_1917
<u>00095</u>	S	desconhecida	S	desconhecida	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	membrana	S	membrana	N	hypothetical protein SP_1912
<u>00133</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	interna	N	BlpS protein
<u>00134</u>	N	desconhecida	N	membrana	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	interna	N	BlpT protein, fusion
<u>00138</u>	S	desconhecida	S	desconhecida	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	N	hypothetical protein SP_0520
<u>00185</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SpneCDC_05065
<u>00196</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	type II DNA modification methyltransferase, putative
<u>00205</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr1278
<u>00209</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	acetyltransferase, GNAT family
<u>00217</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	prolipoprotein diacylglycerol transferase
<u>00265</u>	N	desconhecida	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	psr protein
<u>00270</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr1222
<u>00271</u>	N	membrana	N	desconhecida	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr1221
<u>00315</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate
<u>00333</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component
<u>00397</u>	S	citoplasmática	S	membrana	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
<u>00415</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	C3-degrading proteinase
<u>00427</u>	N	desconhecida	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	DnaQ family exonuclease/DinG family helicase, putative
<u>00429</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_0800
<u>00528</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	S	membrana	N	ylmG protein
<u>00529</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein spr1506
<u>00540</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	efflux ABC transporter, permease protein
<u>00558</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_1459
<u>00566</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	membrana	S	solúvel	S	externa	N	hypothetical protein SP_1467
<u>00579</u>	N	citoplasmática	N	extracelular	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	peptidoglycan GlcNAc deacetylase
<u>00580</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha
<u>00587</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	S	externa	N	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family protein

<u>00589</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	capsular polysaccharide biosynthesis protein, putative
<u>00599</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SpnC_00140
<u>00619</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	Positive transcriptional regulator of mutA
<u>00645</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	peptídeo sinal	membrana	N	membrana	N	membrana	S	methionyl-tRNA synthetase
<u>00723</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	transcriptional regulator, GntR family
<u>00724</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	S	solúvel	N	externa	S	Beta-glucosidase
<u>00726</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	PTS system, IIC component
<u>00727</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	hypothetical protein SpnE_02000121
<u>00743</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp3BS71_05024
<u>00787</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	competence protein CelB
<u>00790</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SpnCDC1_02325
<u>00813</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	foldase protein PrsA
<u>02265</u>	S	parede celular	S	parede celular	peptídeo sinal	membrana	S	solúvel	S	membrana	S	cell wall surface anchor family protein
<u>02273</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SpnC_01145
<u>02277</u>	S	extracelular	S	extracelular	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	membrana	S	membrana	S	choline binding protein C
<u>02284</u>	N	citoplasmática	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	solúvel	N	membrana	N	phosphomevalonate kinase
<u>02288</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	sensor histidine kinase, putative
<u>02337</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_1127
<u>02380</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr1708
<u>02413</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_1077
<u>02416</u>	N	extracelular	N	extracelular	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_1080
<u>02430</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	interna	N	hypothetical protein spr0999
<u>02434</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	adenylate cyclase, putative
<u>00863</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	addiction module antitoxin, RelB/DinJ family protein, putative
<u>00879</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein CGSSp9BS68_08907
<u>00881</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	alcohol dehydrogenase
<u>00885</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SpnE_02001811
<u>00944</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SP_1600
<u>00962</u>	N	desconhecida	N	parede celular	lipoproteína	não citoplasmática	S	solúvel	N	externa	S	thioredoxin family protein
<u>00967</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_0653
<u>00986</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	glycosyl transferase, family 2
<u>01029</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_0031
<u>01049</u>	N	citoplasmática	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein CGSSp14BS69_08820
<u>01050</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	membrana	membrana	N	solúvel	N	membrana	N	hypothetical protein SpnC_08279
<u>01051</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SpnC_10204
<u>01064</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein CGSSp3BS71_11463
<u>01065</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	sensor histidine kinase, putative
<u>01090</u>	N	citoplasmática	N	membrana	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein spr1796
<u>01127</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SP_1945
<u>01133</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein CGSSp14BS69_13233
<u>01135</u>	N	Extracelular	N	extracelular	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	autolysin
<u>01159</u>	N	extracelular	N	desconhecida	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein CGSSp14BS69_00480
<u>01161</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SpnE_02001880
<u>01163</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein spr1926
<u>01164</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SP_2115
<u>01195</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	ABC transporter, permease protein, putative
<u>01201</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp18BS74_00160
<u>01203</u>	N	citoplasmática	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SpnE_02000236

<u>01188</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	putative sensor histidine kinase ComD
<u>01208</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	membrana	N	membrana	S	rod shape-determining protein MreC
<u>01209</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	S	membrana	N	membrana	S	rod shpae-determining protein MreD, putative
<u>01225</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein CGSSp3BS71_06714
<u>01230</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	S	membrana	S	ribonuclease HIII
<u>01364</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	S	23S rRNA m1G745 methyltransferase
<u>01370</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	type I restriction-modification system, M subunit, putative
<u>01473</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	ribosomal protein L11 methyltransferase
<u>01529</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp6BS73_09384
<u>01556</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	thiamine-phosphate pyrophosphorylase
<u>01557</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hydroxyethylthiazole kinase, putative
<u>01558</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_0723
<u>01560</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr0633
<u>01562</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein CGSSp3BS71_08791
<u>01563</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	thiamine-phosphate pyrophosphorylase
<u>01575</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr0618
<u>01577</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SpnC_01195
<u>01587</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_0682
<u>01610</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	sensor histidine kinase, putative
<u>01632</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	Non Cytoplasmic	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein spr0927
<u>01644</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	Non Cytoplasmic	N	solúvel	N	externa	N	iron-compound ABC transporter, ATP-binding protein
<u>01652</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	membrane protein
<u>01655</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein
<u>01656</u>	N	citoplasmática	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein spr1904
<u>01658</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SpnC_010519
<u>01672</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SpnCDC1_08138
<u>01679</u>	N	desconhecida	N	membrana	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	membrana	S	membrana	S	competence protein CgID
<u>01726</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	fatty acid/phospholipid synthesis protein
<u>01758</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	S	externa	N	hypothetical protein SP_1786
<u>01775</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	acetyltransferase, GNAT family protein
<u>01777</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	S	Type 4 prepilin peptidase
<u>01816</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_1712
<u>01837</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein CGSSp9BS68_04155
<u>01862</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp6BS73_08579
<u>01891</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein spr0510
<u>01900</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	acetyltransferase, GNAT family protein
<u>01903</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein spr0521
<u>01909</u>	S	membrana	S	membrana	peptídeo sinal	membrana	S	membrana	N	membrana	S	transmembrane protein Vexp3
<u>01912</u>	N	membrana	N	desconhecida	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	cysteinyI-tRNA synthetase
<u>01926</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SpnC_02001253
<u>01929</u>	S	desconhecida	S	desconhecida	lipoproteína	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein, putative
<u>01961</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	competence protein ComF, putative
<u>01967</u>	S	desconhecida	S	extracelular	Signal	não citoplasmática	S	membrana	N	externa	S	Choline binding protein D
<u>01996</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	DNA mismatch repair protein
<u>01997</u>	N	desconhecida	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	riboflavin synthase subunit alpha
<u>01998</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	riboflavin synthase subunit alpha
<u>02003</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein SP_0184
<u>02009</u>	S	desconhecida	S	desconhecida	lipoproteína	não citoplasmática	S	membrana	S	externa	S	hypothetical protein SP_0191

<u>02072</u>	S	desconhecida	S	membrana	lipoproteína	não citoplasmática	S	membrana	S	externa	S	iron-compound ABC transporter, iron-compound-binding protein
<u>02074</u>	N	desconhecida	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	iron-compound ABC transporter, permease protein
<u>02080</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein SP_1864
<u>02116</u>	N	desconhecida	N	desconhecida	citoplasmática	citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp14BS69_10426
<u>02118</u>	N	membrana	N	membrana	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	ABC transporter, ATP-binding protein
<u>02119</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	ABC transporter, permease protein
<u>02121</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	MgtC/SapB family protein
<u>02122</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	sugar-binding transcriptional regulator, LacI family
<u>02172</u>	N	citoplasmática	N	membrana	membrana	membrana	S	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein SP_0153
<u>02179</u>	N	membrana	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	S	hypothetical protein CGSSp19BS75_11308
<u>02180</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	hypothetical protein CGSSp19BS75_11313
<u>02204</u>	N	citoplasmática	N	membrana	membrana	membrana	N	membrana	N	membrana	N	hypothetical protein spr0296
<u>02209</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	S	externa	N	PTS system, IIA component
<u>02212</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase
<u>02226</u>	N	citoplasmática	N	citoplasmática	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	DNA polymerase III, delta prime subunit
<u>02232</u>	S	extracelular	S	extracelular	peptídeo sinal	não citoplasmática	S	solúvel	S	externa	S	CbpE
<u>02256</u>	N	citoplasmática	N	desconhecida	citoplasmática	não citoplasmática	N	solúvel	N	externa	N	site-specific tyrosine recombinase XerD-like protein

¹N – não, ausência de peptídeo sinal, ²S – sim, presença de peptídeo sinal. Os 99 genes sublinhados foram re-analisados e um total de 20 foram selecionados para amplificação, clonagem, expressão e purificação.

Anexo 11: Purificação das proteínas recombinantes pneumocócicas: 01909, 00265, 01065, 00080, 00962, 02009, 01929, 02072, 02232, 02277, 01967, 00589, 00787, 00397, 01195, 02265, 00271 e 00062.

Purificação da proteína 01909:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem a adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. A Figura 5.7.2 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 01909. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

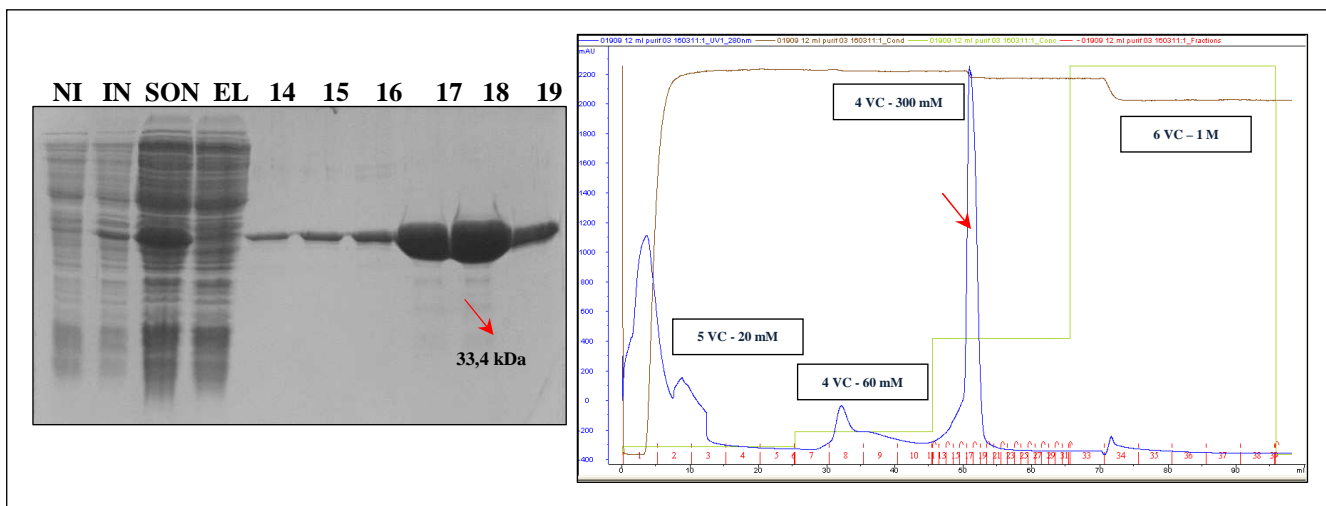


Figura 1: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 01909. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. NI, lisado da cultura de *E. coli* não induzida; IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; SON, sonicado (lisado total sonicado, da cultura de *E. coli* induzida, aplicado na coluna); EL, eluato (proteínas não adsorvidas na coluna); frações 14 a 19 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM de imidazol, não havendo perda proteica detectável nem no eluato (fração não adsorvida) e nem nas frações de 20 mM e 60 mM de imidazol (frações 1 a 10) (dados não mostrados). A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 1,2 mg/mL e pureza de 97%.

Purificação da proteína 00265:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem a adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. A Figura 5.7.3 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 00265. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

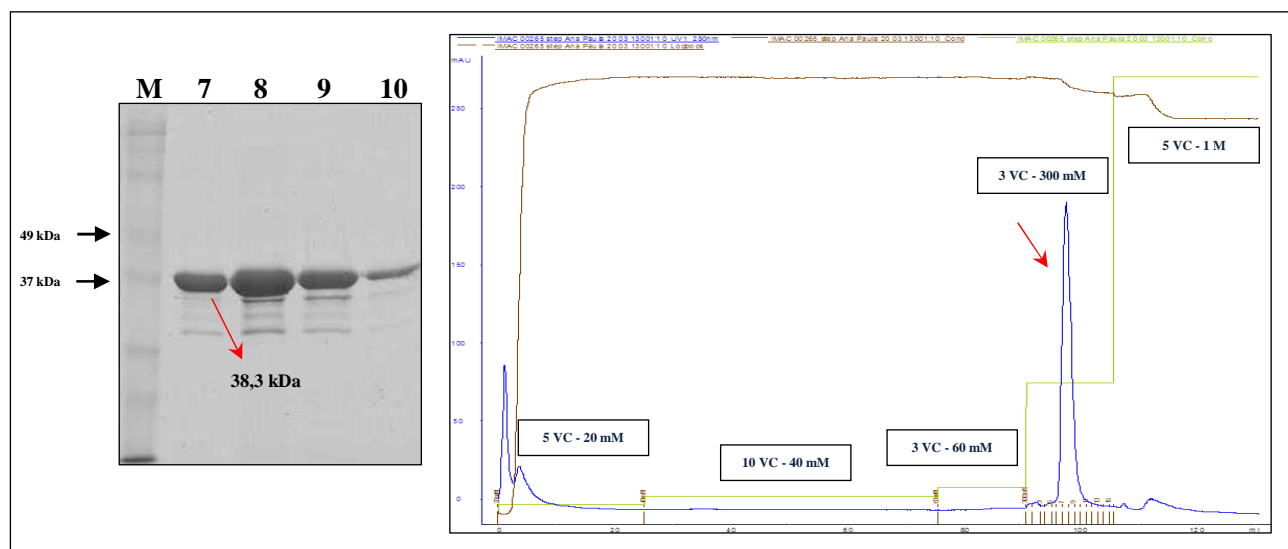


Figura 2: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 00265. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. M, “BenchMark Pre-Stained Protein Ladder” (Life Technologies); frações 7 a 10 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em marrom (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM de imidazol e sem a presença significativa de contaminantes; houve um pouco de perda proteica no eluato (material não adsorvido) (dado não mostrado). A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 0,8 mg/mL e pureza de 91%.

Purificação da proteína 01065:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem a adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. A Figura 5.7.4 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 01065. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

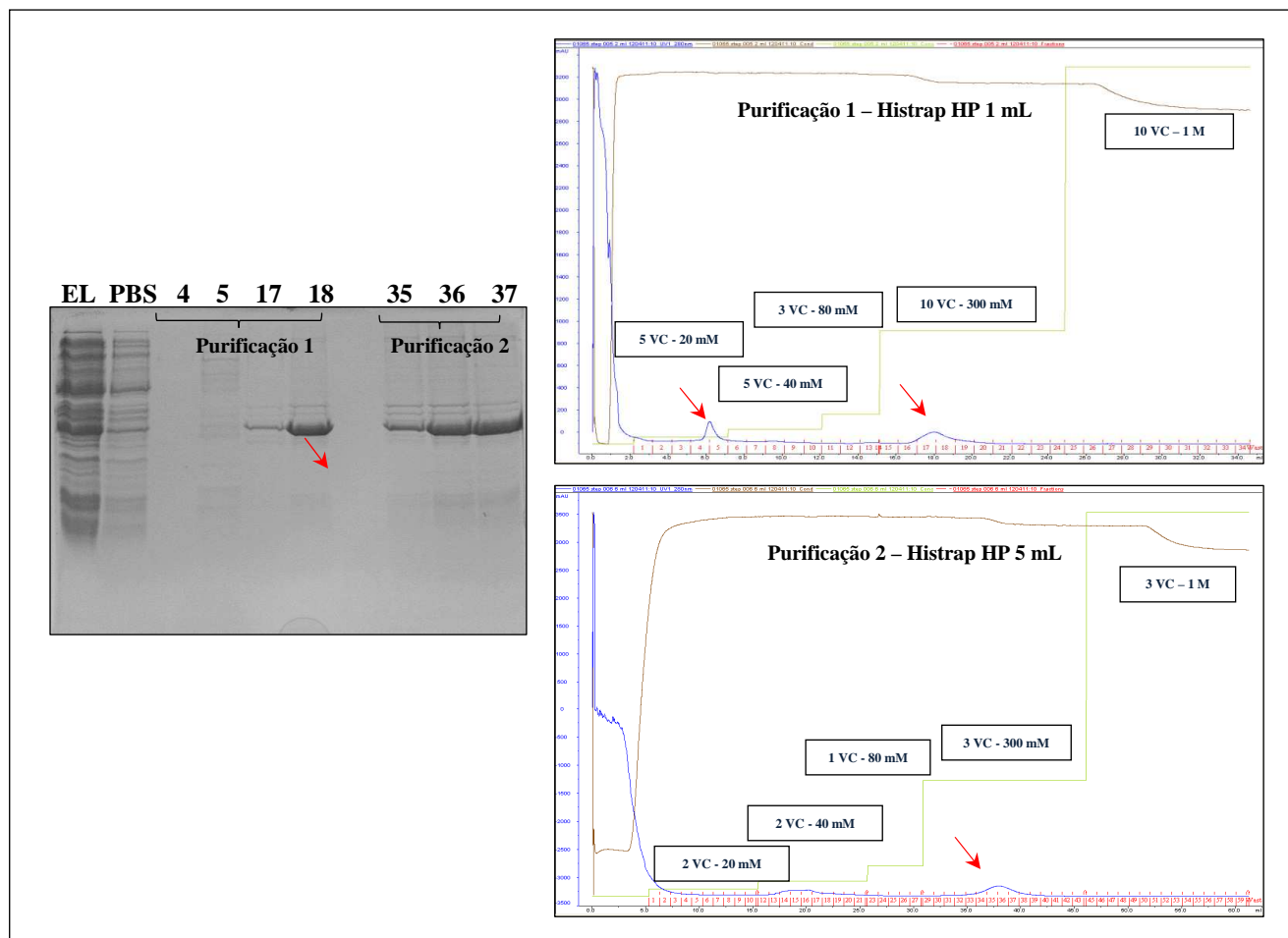


Figura 3: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 01065. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. EL, eluato (proteínas não adsorvidas na coluna); PBS: proteínas eluídas da coluna lavada com PBS pH 7,4; frações 4 e 5 – proteína (s) eluída (s) com 20 mM de imidazol; frações 17 e 18 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol; frações 35 a 37 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM, no entanto houve perda proteica no eluato (material não adsorvido) (dado não mostrado). A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 0,5 mg/mL e pureza de 80%.

Purificação da proteína 00080:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 28°C sem a adição de detergente triton X-100 no tampão de lise. No entanto como essa proteína apresentou problema de precipitação após a purificação, utilizamos o detergente durante todo processo purificativo para manter a solubilidade da mesma. A Figura 5.7.5 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 00080. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

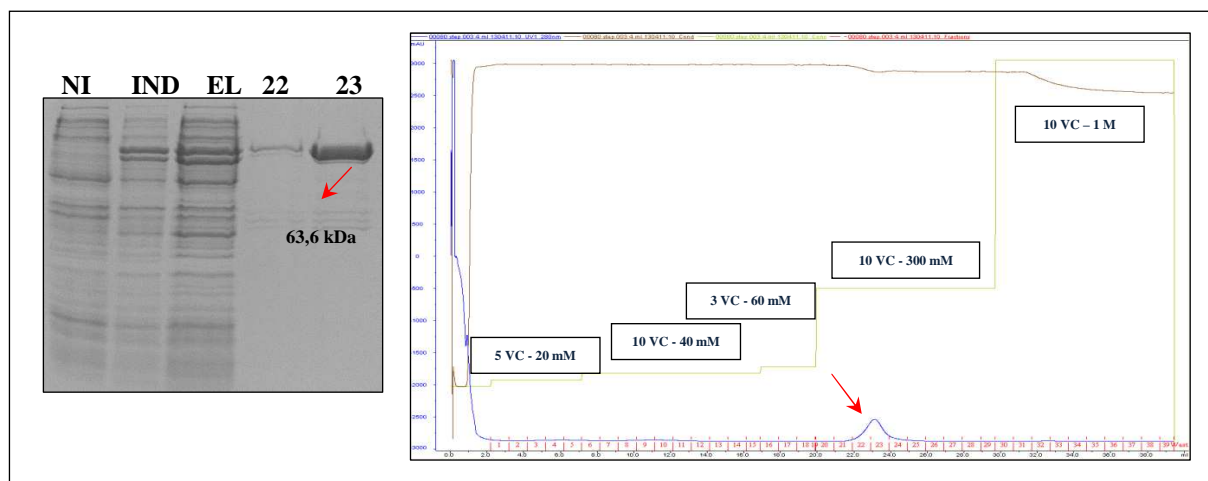


Figura 4: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 00080. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. NI, lisado da cultura de *E. coli* não induzida; IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; EL, eluato (proteínas não adsorvidas na coluna); frações 22 e 23 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM de imidazol e sem a presença significativa de contaminantes; houve perda proteica no eluato (material não adsorvido) como também precipitação de parte do material eluído. Em função disso, foi realizado um “pool” das frações eluídas nas diversas purificações realizadas (empregando-se o processo de purificação descrito na Figura 5.7.5). O material foi centrifugado e o sobrenadante concentrado com “Amicon Ultra-15” (Millipore) de acordo com as recomendações do fabricante. A proteína concentrada foi dialisada contra tampão PBS pH 7,4 contendo 0,005% de triton X-100. A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 0,3 mg/mL e pureza de 51%.

Novas purificações foram realizadas com otimização do protocolo visando aumentar a concentração, estabilidade e solubilidade proteica. O protocolo que apresentou o melhor resultado e reprodutibilidade foi alcançado aumentando as lavagens com 20 mM e 60 mM para 10 VC cada, sendo que a proteína purificada, utilizando esta metodologia, e dialisada apresentou concentração de 0,7 mg/mL e pureza de 86%.

Purificação da proteína 00962:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. No entanto como esta proteína apresentou problema de precipitação após a purificação, utilizamos o detergente durante todo processo purificativo. A Figura 5.7.6 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 00962. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

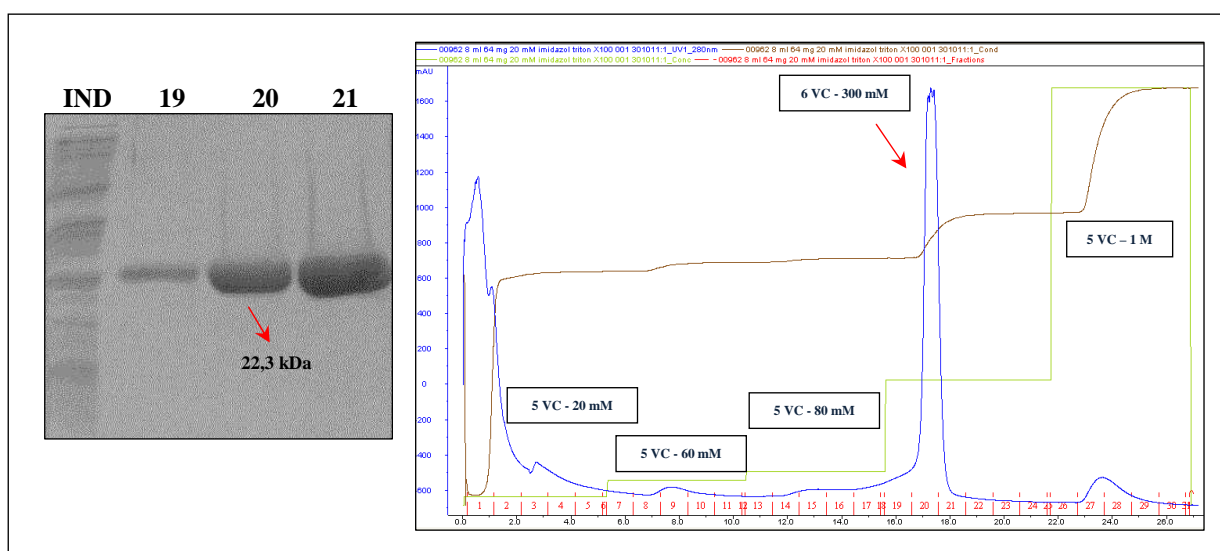


Figura 5: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, da purificação da proteína 00962. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; frações 19 a 21 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM e sem a presença significativa de contaminantes; não houve perda proteica detectável no eluato (material não adsorvido) (dado não mostrado). A proteína purificada e dialisada apresentou concentração de 1,2 mg/mL e pureza de 97%.

Purificação das proteínas 02009 e 01929:

Estas proteínas foram expressas de forma solúvel a 37°C sem adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. As Figuras 5.7.7 e 5.7.8 ilustram os resultados obtidos para as purificações das proteínas 02009 e 01929 empregando gradientes de purificação sem imidazol na amostra inicial (painel A) e com imidazol (20 mM) na amostra inicial (painel B). Tendo em vista que essas duas proteínas foram purificadas de forma satisfatória, não testamos o processo empregando etapas de purificação.

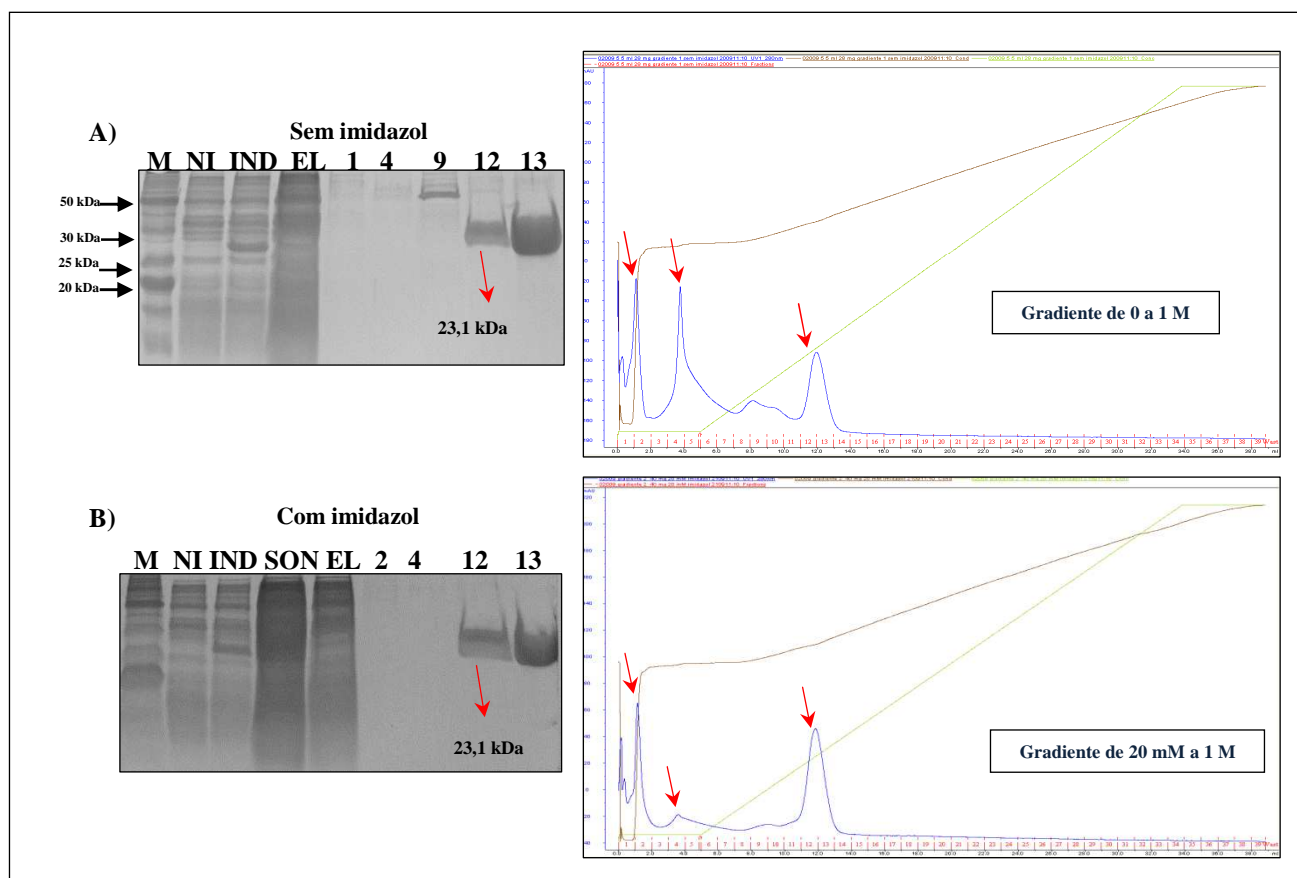


Figura 6: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, da purificação da proteína 02009. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. M, “Bench Mark Protein ladder”; NI, lisado da cultura de *E. coli* não induzida; IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; SON, sonificado (lisado total sonificado, da cultura de *E. coli* induzida, aplicado na coluna); EL, eluato (proteínas não adsorvidas na coluna); **A)** frações 1 e 4 – proteínas eluídas após lavagens da coluna com PBS pH 7,4; frações 9, 12 e 13 – proteína (s) eluída (s) com cerca de 180 mM a 230 mM de imidazol; **B)** frações 2 e 4 – proteínas eluídas após lavagens da coluna com PBS pH 7,4 contendo 20 mM de imidazol; frações 12 e 13 – proteína (s) eluída (s) com cerca de 180 mM a 230 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde o gradiente de purificação (concentração crescente de imidazol); a linha em marrom a condutância.

Verificamos que em ambas as metodologias utilizadas a proteína 02009 foi eluída apenas nas frações 12 e 13 (cerca de 180 mM a 230 mM de imidazol) e sem a presença

significativa de contaminantes; não houve perda proteica detectável no eluato (material não adsorvido). Foi realizado “pool” das frações eluídas sendo que a proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 1,0 mg/mL e pureza de 80%.

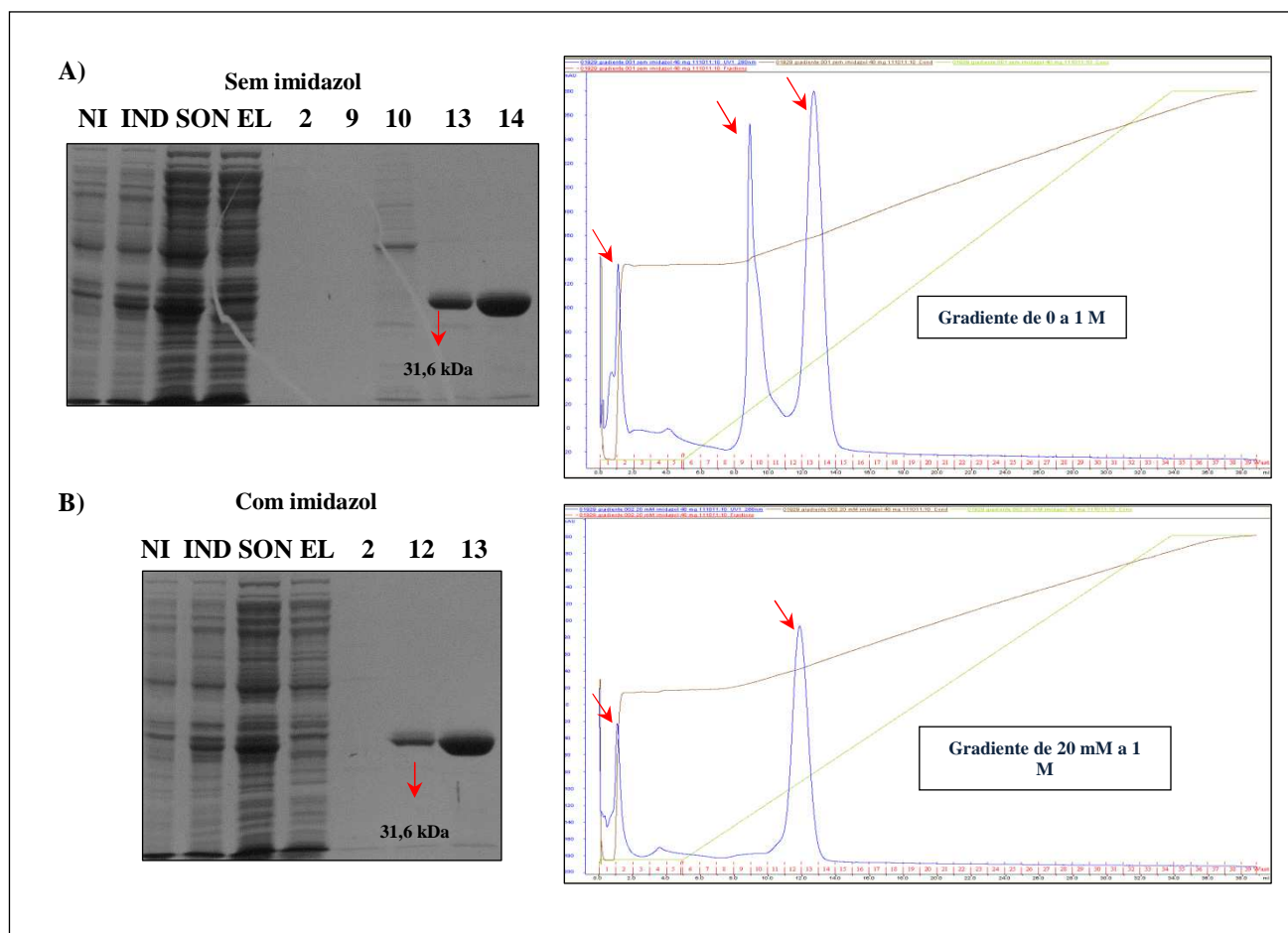


Figura 7: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 01929. Os géis foram corados empregando comassie blue-R 250. NI, lisado da cultura de *E. coli* não induzida; IND, lisado da cultura de *E. coli* induzida; SON, sonicado (lisado total sonicado, da cultura de *E. coli* induzida, aplicado na coluna); EL, eluato (proteínas não adsorvidas na coluna); **A)** frações 2, 9 e 10 – proteínas eluídas após: lavagens da coluna com PBS pH 7,4 (2) e com cerca de 130 mM a 170 mM de imidazol (9 e 10); frações 13 e 14 – proteína (s) eluída (s) com cerca de 200 mM a 300 mM de imidazol; **B)** fração 2 – proteínas eluídas após lavagem da coluna com PBS pH 7,4 contendo 20 mM de imidazol; frações 12 e 13 – proteína (s) eluída (s) com cerca de 200 mM a 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde o gradiente de purificação (concentração crescente de imidazol); a linha em marrom a condutância.

Verificamos que em ambas as metodologias utilizadas a proteína 01929 foi eluída apenas nas frações 12 a 14 (cerca de 200 mM a 300 mM de imidazol), sem presença significativa de contaminantes; não houve perda proteica detectável no eluato (material não adsorvido). Foi realizado “pool” das frações eluídas e a proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 0,7 mg/mL e pureza de 81%.

Purificação da proteína 02072:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. No entanto como essa proteína apresentou problema de precipitação após a purificação, utilizamos o detergente durante todo processo purificativo. A Figura 5.7.9 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 02072. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

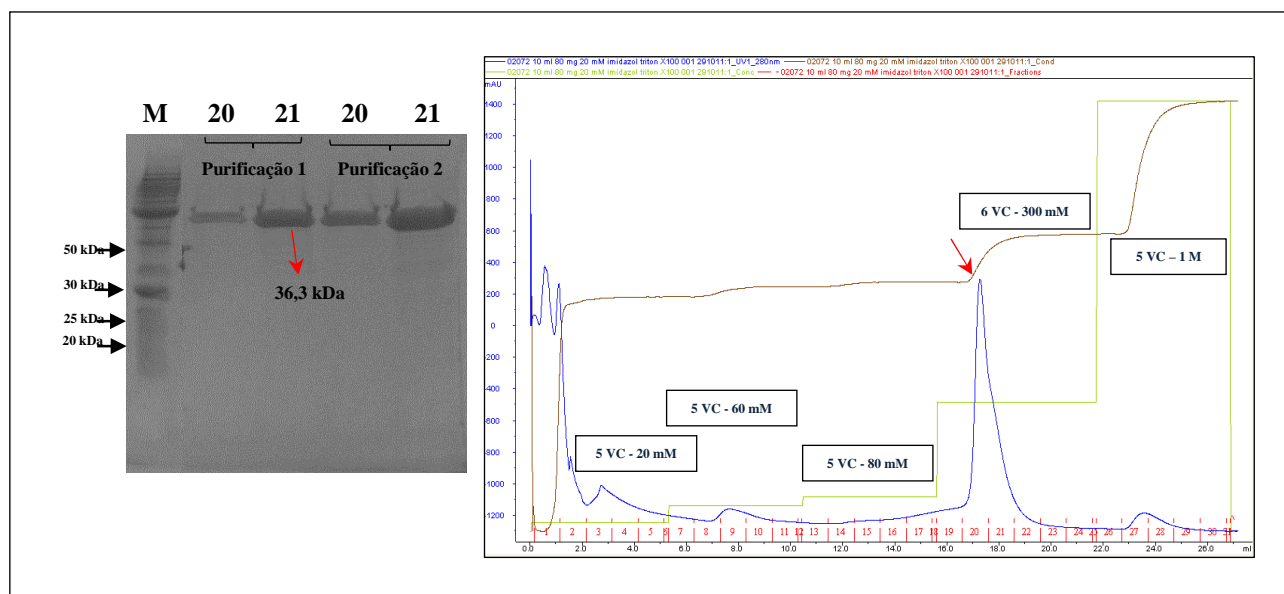


Figura 8: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 02072. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. M, “Bench Mark protein ladder”; frações 20 e 21 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 300 mM de imidazol, sem a presença significativa de contaminantes; não houve perda proteica detectável no eluato (material não adsorvido) (dado não mostrado). A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 0,7 mg/mL e pureza de 90%.

Purificação da proteína 02232:

Esta proteína foi expressa de forma solúvel a 37°C sem a adição do detergente triton X-100 no tampão de lise. A Figura 5.7.10 ilustra o resultado obtido para a purificação da proteína 02232. As etapas de purificação empregadas estão indicadas no cromatograma.

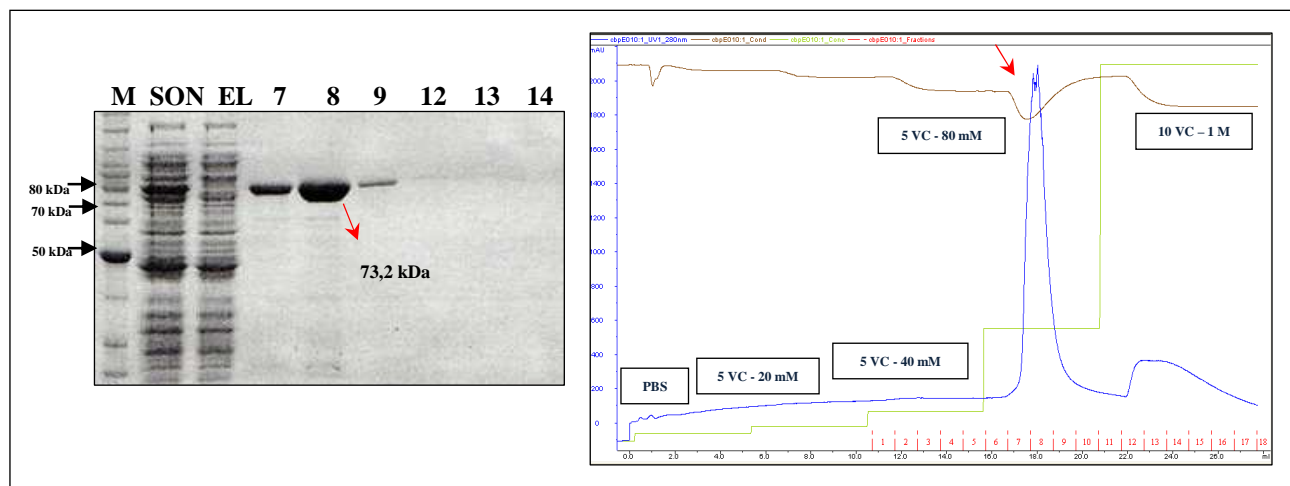


Figura 9: Análise, por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, da purificação da proteína 02232. O gel foi corado empregando comassie blue-R 250. M, “Bench Mark Protein ladder”; frações 7 a 9 – proteína (s) eluída (s) com 300 mM de imidazol; frações 12 a 14 – proteína (s) eluída (s) com 1 M de imidazol. No cromatograma os números em vermelho (eixo dos x) representam as frações coletadas; a linha em azul a Abs₂₈₀; a linha em verde as concentrações de imidazol utilizadas nas etapas de purificação; a linha em marrom a condutância.

Verificamos que a proteína foi eluída nas frações de 80 mM de imidazol, sem a presença significativa de contaminantes; não houve perda proteica detectável no eluato (material não adsorvido). A proteína purificada após dialisada apresentou concentração de 1 mg/ml e pureza de 80%.

Purificação das proteínas 02277, 01967, 00589, 00787, 00397, 01195, 02265, 00271 e 00062)

Para essas proteínas foram aplicados e avaliados diversos protocolos de purificação, dentre eles a purificação do corpo de inclusão seguido de utilização de agente desnaturante para aquelas proteínas que demonstraram ser insolúveis. Contudo, não obtivemos êxito na purificação dessas proteínas. Entre os problemas apresentados nas purificações estão: a baixa interação com a matriz carregada com níquel, levando a perda proteica no eluato (material não adsorvido), o alto percentual de contaminantes ou a completa precipitação proteica durante e após o processo de purificação. Assim sendo, prosseguimos o estudo com as 10 proteínas que conseguimos purificar com êxito.

Anexo 12: Presença dos genes em amostras de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus pseudopneumoniae*

Gene em SPN 5 617/00	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>S. oralis</i> ATCC 10557	<i>S. mitis</i> B6	<i>S. mitis</i> projeto WGS ¹	<i>S. oralis</i> Uo5	<i>S. oralis</i> projeto WGS	<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493	<i>S. pseudopneumoniae</i> projeto WGS
Gene amplificado por PCR (este estudo)			Presença de proteínas identificadas por “blastp” (60% de identidade e 70% de “overlap” para o primeiro HSP)					
00062	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00265	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00271	sim	não	sim	sim	não	sim	sim	sim
00589	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00962	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
01065	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
01195	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
01909	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
01929	não	não	sim	sim	não	não	sim	sim
01967	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
02009	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
02072	sim	sim	não	sim	não	sim	sim	sim
02232	sim	não	sim	sim	não	não	sim	sim
00333	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00080	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00397	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
00787	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim

¹WGS – “Whole Shotgun Genomes”

Os genomas de *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae* e *S. pasteurianus* disponíveis no “GenBank” utilizados para verificarmos a presença das proteínas de pneumococos foram:

Genoma	Número de proteínas anotadas
<i>S. pasteurianus</i> ATCC 43144 NC_015600	1.869
<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493 NC_015875	2.230
<i>S. pseudopneumoniae</i> NZ_AICS00000000	2.113
<i>S. pseudopneumoniae</i> NZ_AJKE00000000	2.154
<i>S. mitis</i> B6 NC_013853	2.004
<i>S. mitis</i> NZ_AEDT00000000	1.757
<i>S. mitis</i> NZ_AEDU00000000	1.893
<i>S. mitis</i> NZ_AEDV00000000	1.871
<i>S. mitis</i> NZ_AEDX00000000	1.636
<i>S. mitis</i> NZ_AEEN00000000	1.793
<i>S. mitis</i> NZ_AFQT00000000	2.003
<i>S. mitis</i> NZ_AFQV00000000	1.854
<i>S. mitis</i> NZ_AFUB00000000	2.006
<i>S. mitis</i> NZ_AFUF00000000	1.850
<i>S. mitis</i> NZ_AFUO00000000	1.861
<i>S. mitis</i> NZ_AICR00000000	1.910
<i>S. mitis</i> NZ_AICU00000000	1.937
<i>S. mitis</i> NZ_AJL00000000	1.908
<i>S. mitis</i> NZ_ALCH00000000	1.678
<i>S. oralis</i> NZ_ADMV00000000	1.847
<i>S. oralis</i> NZ_AEDW00000000	1.793
<i>S. oralis</i> NZ_AFNM00000000	2.005
<i>S. oralis</i> NZ_AFUU00000000	2.022
<i>S. oralis</i> NZ_AICT00000000	1.763
<i>S. oralis</i> NZ_AJKP00000000	1.925
<i>S. oralis</i> NZ_AJKO00000000	1.879
<i>S. oralis</i> NZ_ALJN00000000	2.007
<i>S. oralis</i> NZ_AJKQ00000000	1.895
<i>S. oralis</i> Uo5 NC_015291	1.907

Anexo 13: Árvores filogenéticas

Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de nucleotídeos dos genes.

Para as análises filogenéticas baseadas na máxima verossimilhança foram utilizados todos os sítios alinhados com o algoritmo MUSCLE dentro do programa MEGA 5.2. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o modelo Tamura-Nei. Para avaliarmos a confiabilidade dos ramos foram geradas 100 replicatas de “bootstrap”. SPN, sequências gênicas de amostras de *S. pneumoniae* disponíveis no “GenBank”; SP, sequências gênicas de amostras de origem clínica de *S. pneumoniae* (este estudo).

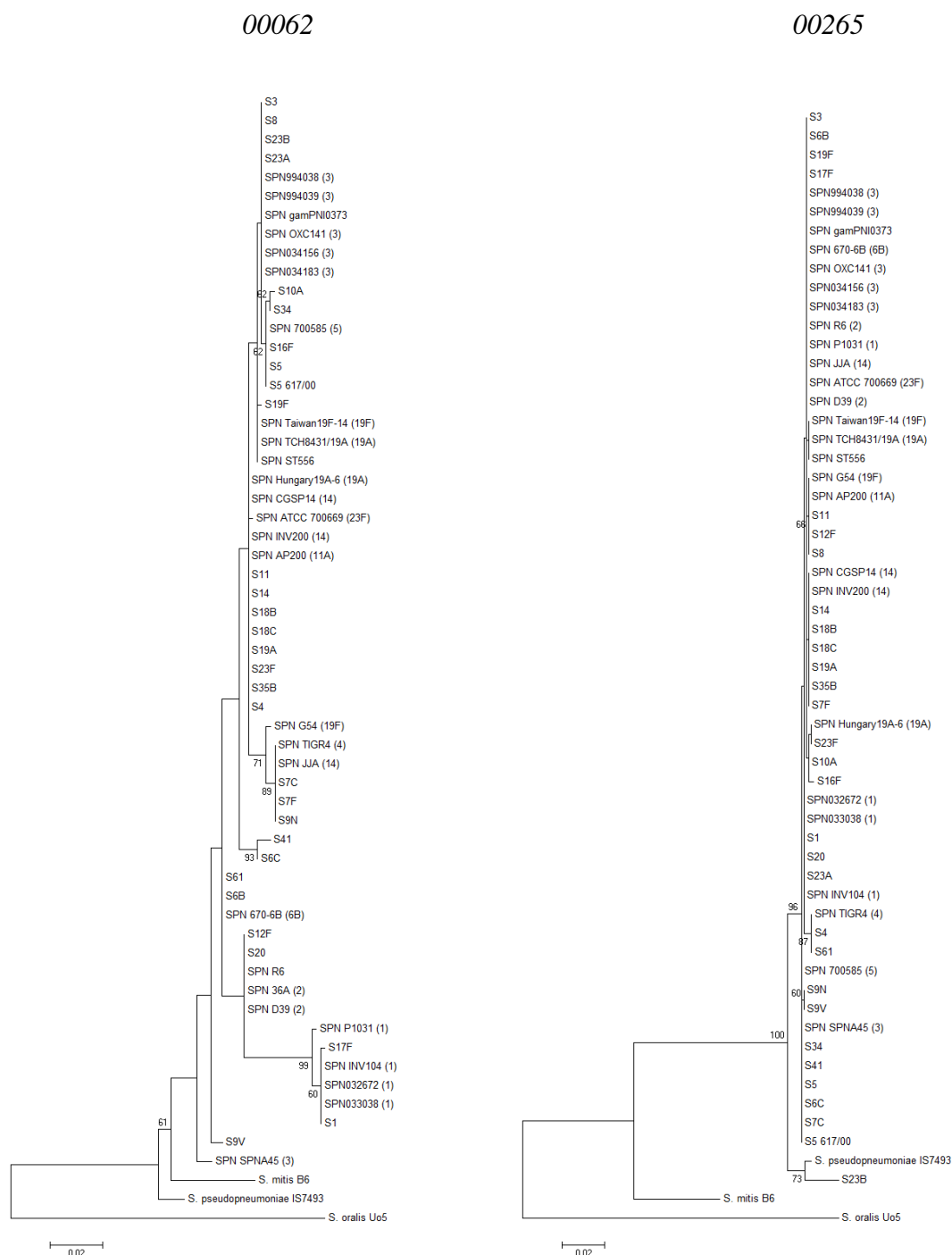


Figura 1: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de nucleotídeos dos genes 00062 e 00265 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

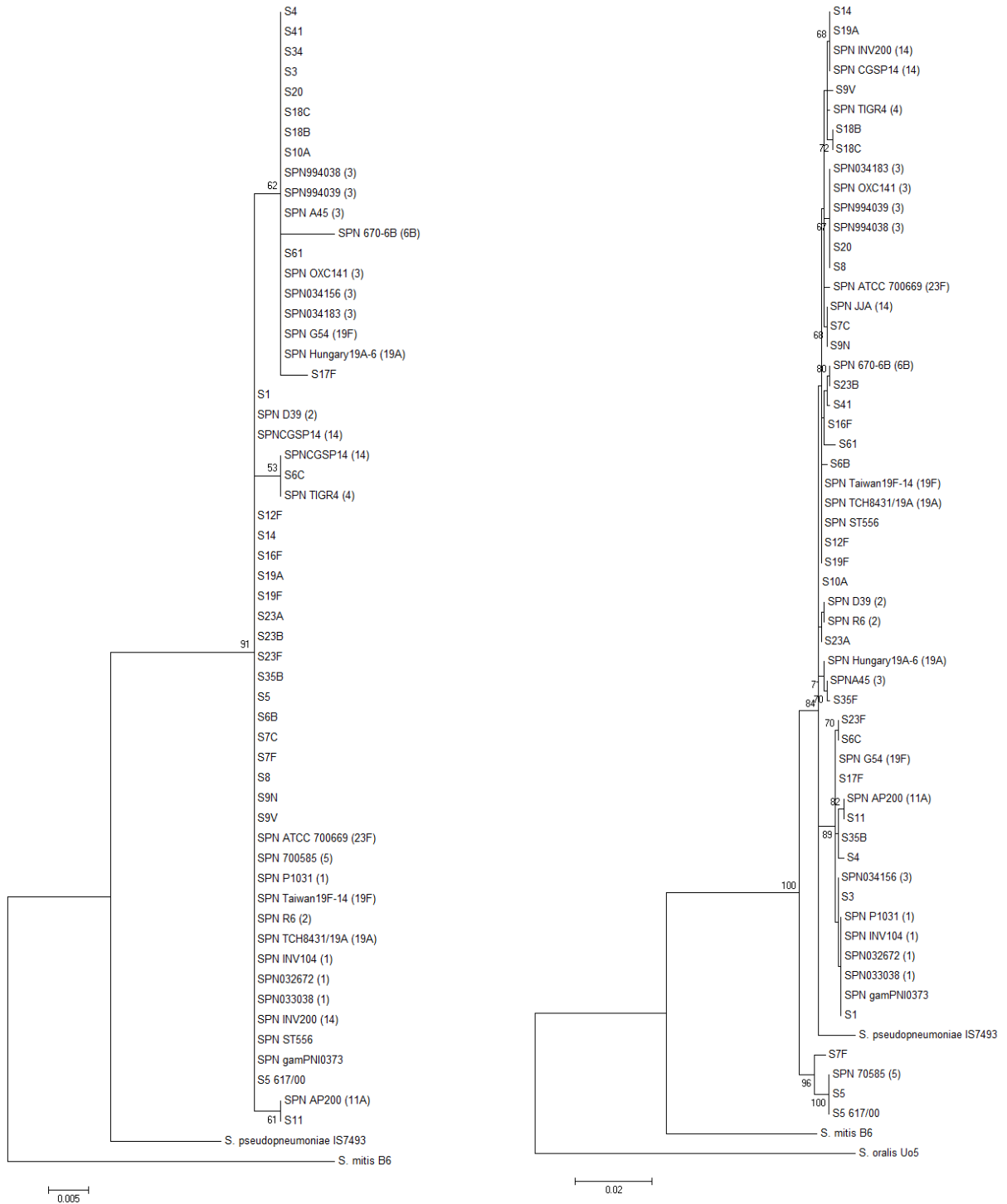


Figura 2: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de nucleotídeos dos genes 00271 e 00589 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

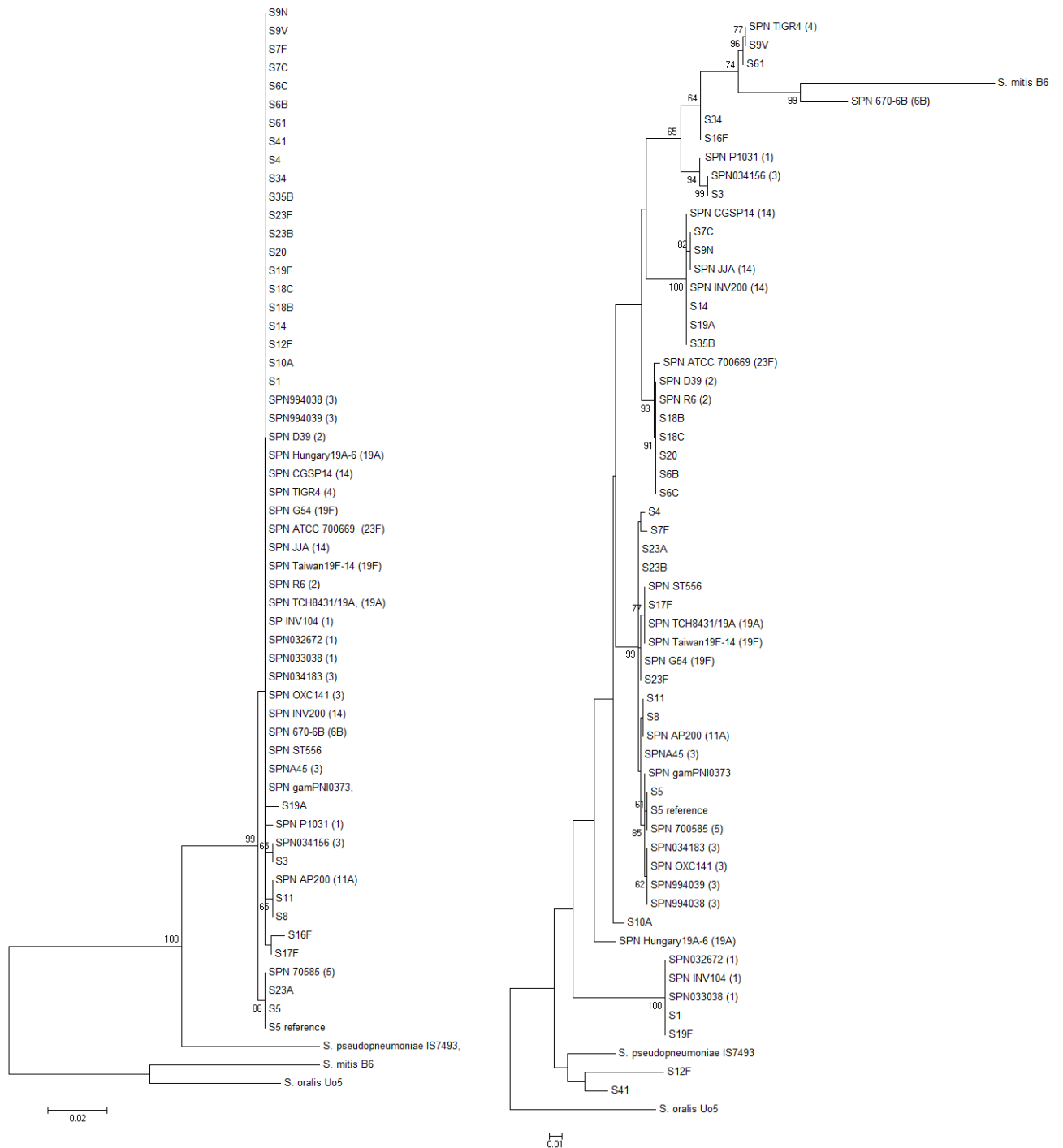


Figura 3: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de nucleotídeos dos genes *00962* e *01065* mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

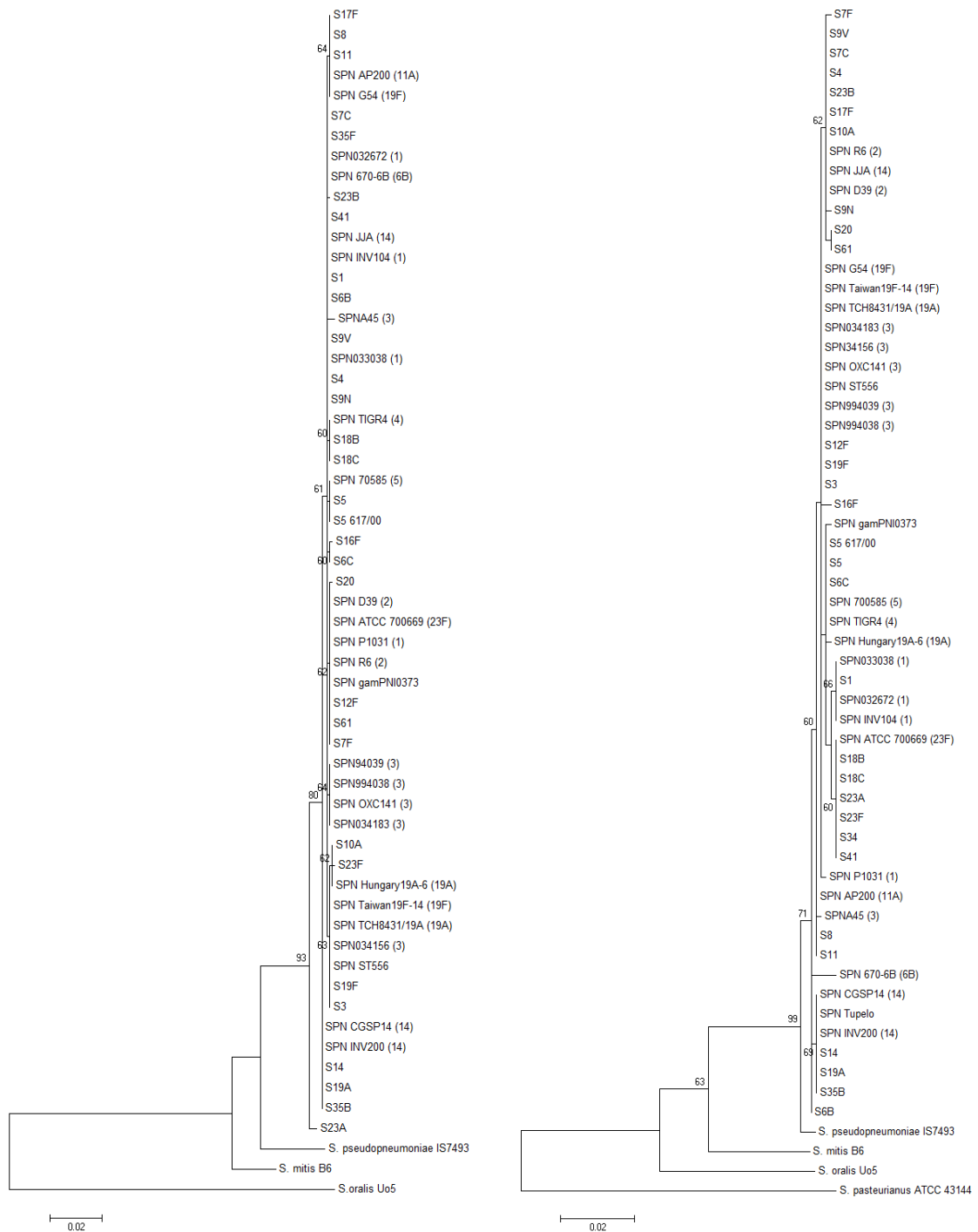


Figura 4: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das equências de nucleotídeos dos genes 01185 e 01909 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

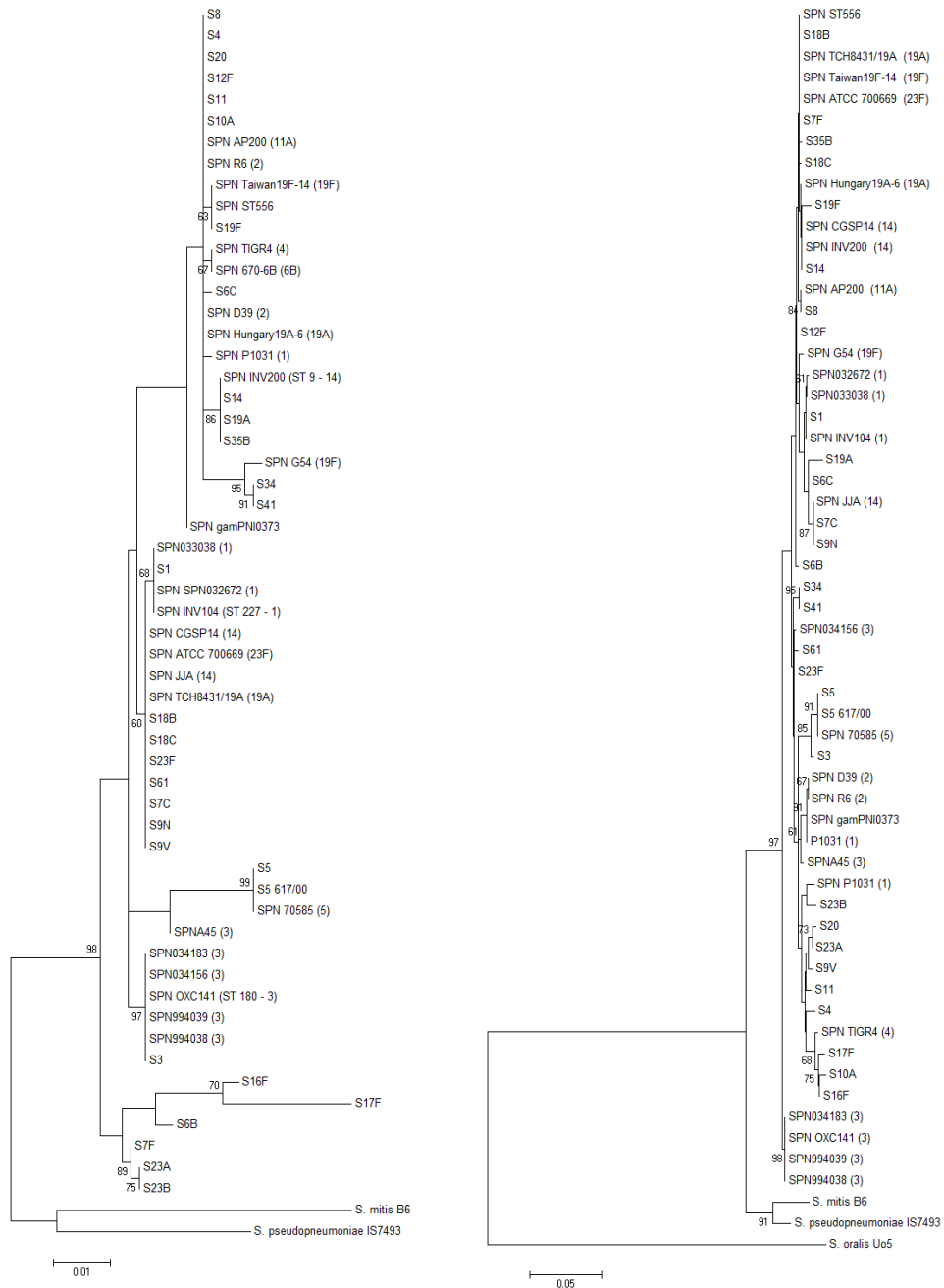


Figura 5: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das equências de nucleotídeos dos genes 01929 e 01967 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

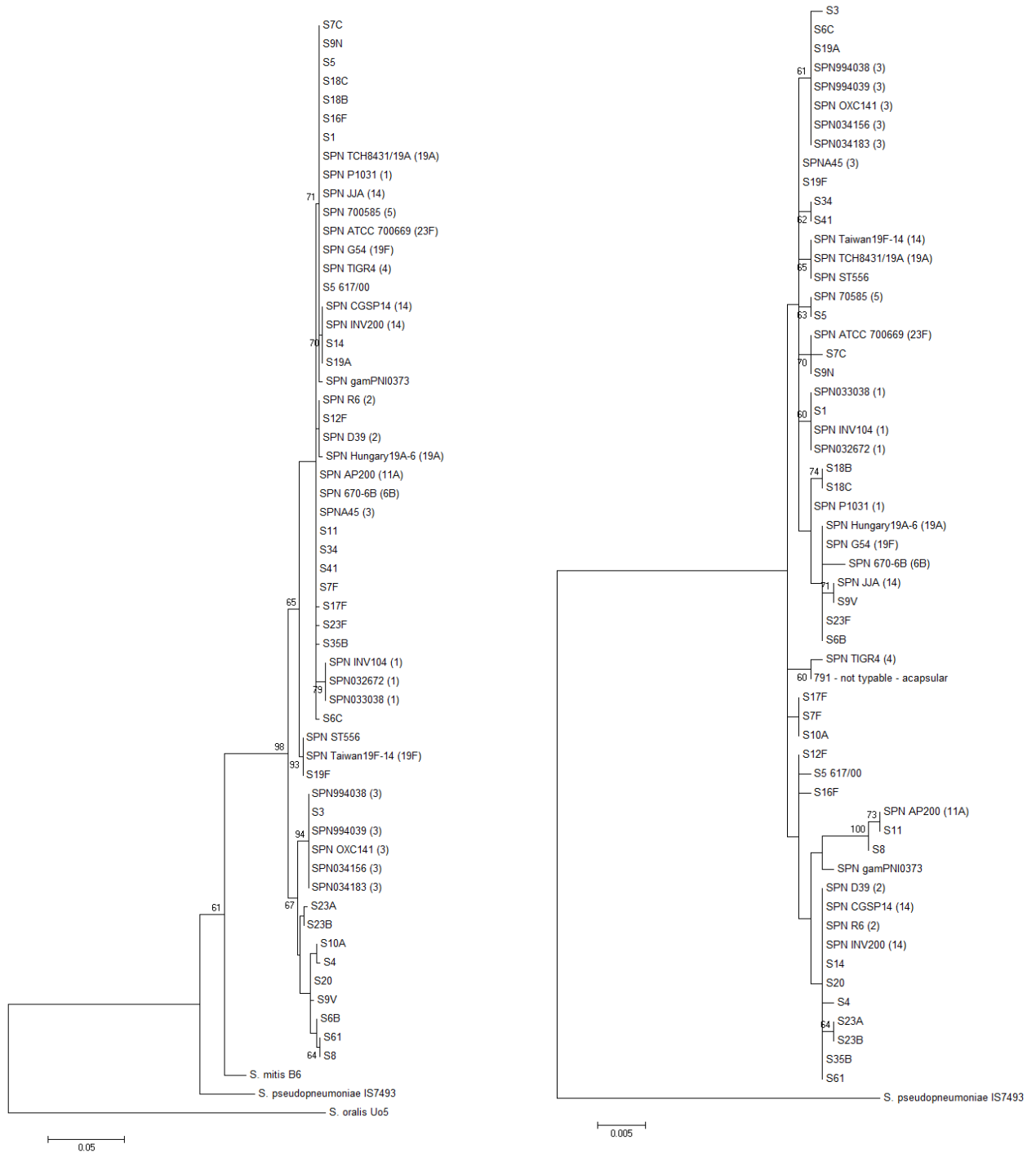


Figura 6: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de nucleotídeos dos genes *02009* e *02072* mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

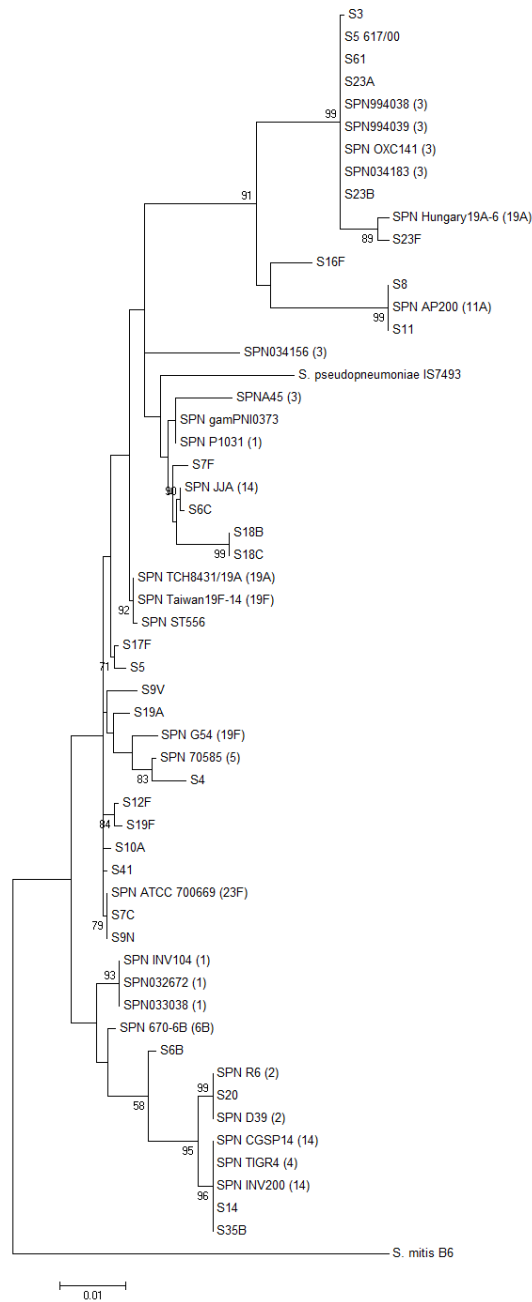


Figura 7: Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene 02232 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências aminoacídicas das proteínas.

Para as análises filogenéticas utilizamos o programa “MEGA 5.2” empregando a análise filogenética de máxima verossimilhança. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o modelo Jones-Taylor-Thornton. Para avaliarmos a confiabilidade dos ramos foram geradas 100 replicatas de “bootstrap”. SPN, sequências de aminoácidos de amostras de *S. pneumoniae* disponíveis no “GenBank”; SP, sequências de aminoácidos de amostras de origem clínica de *S. pneumoniae* (este estudo).

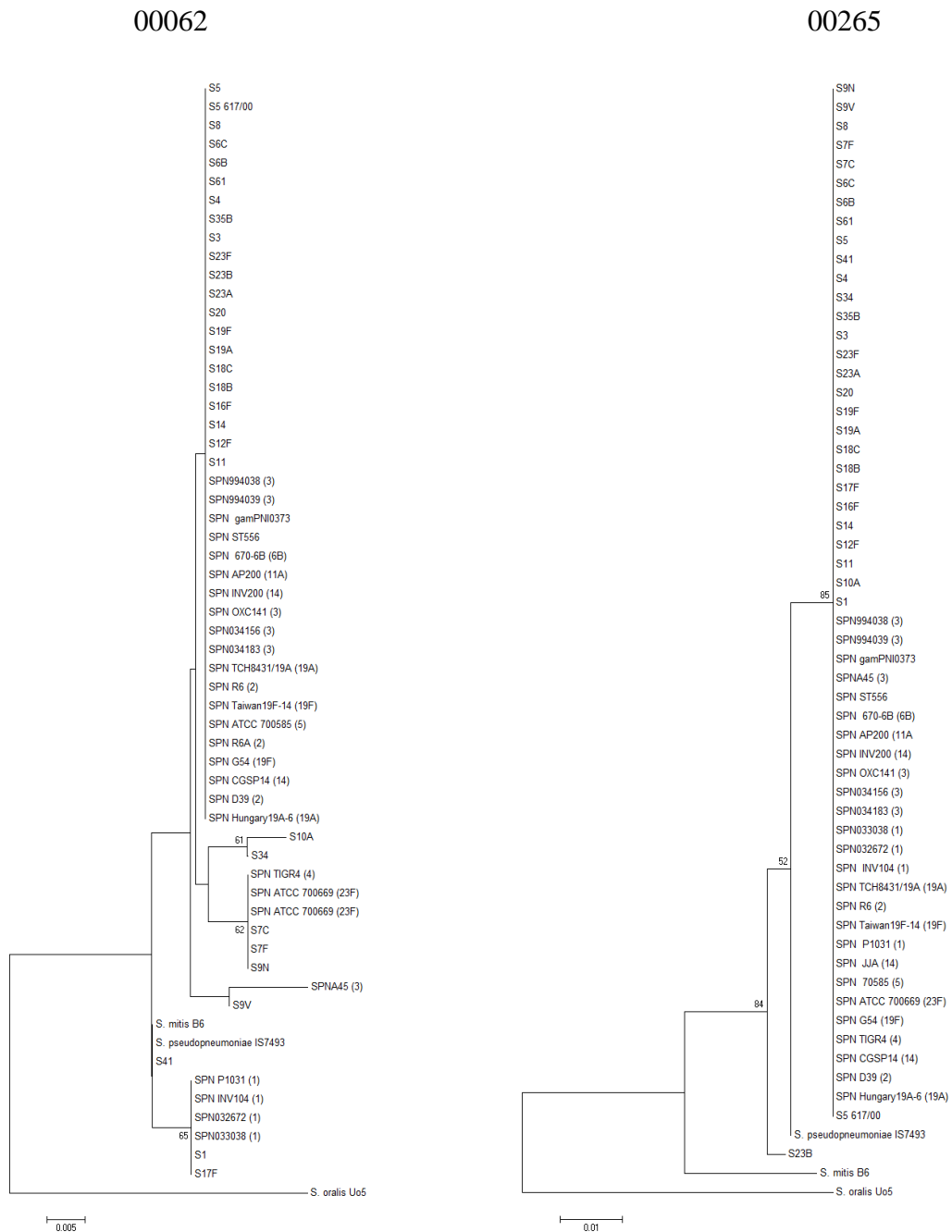


Figura 1: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 00062 e 00265 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

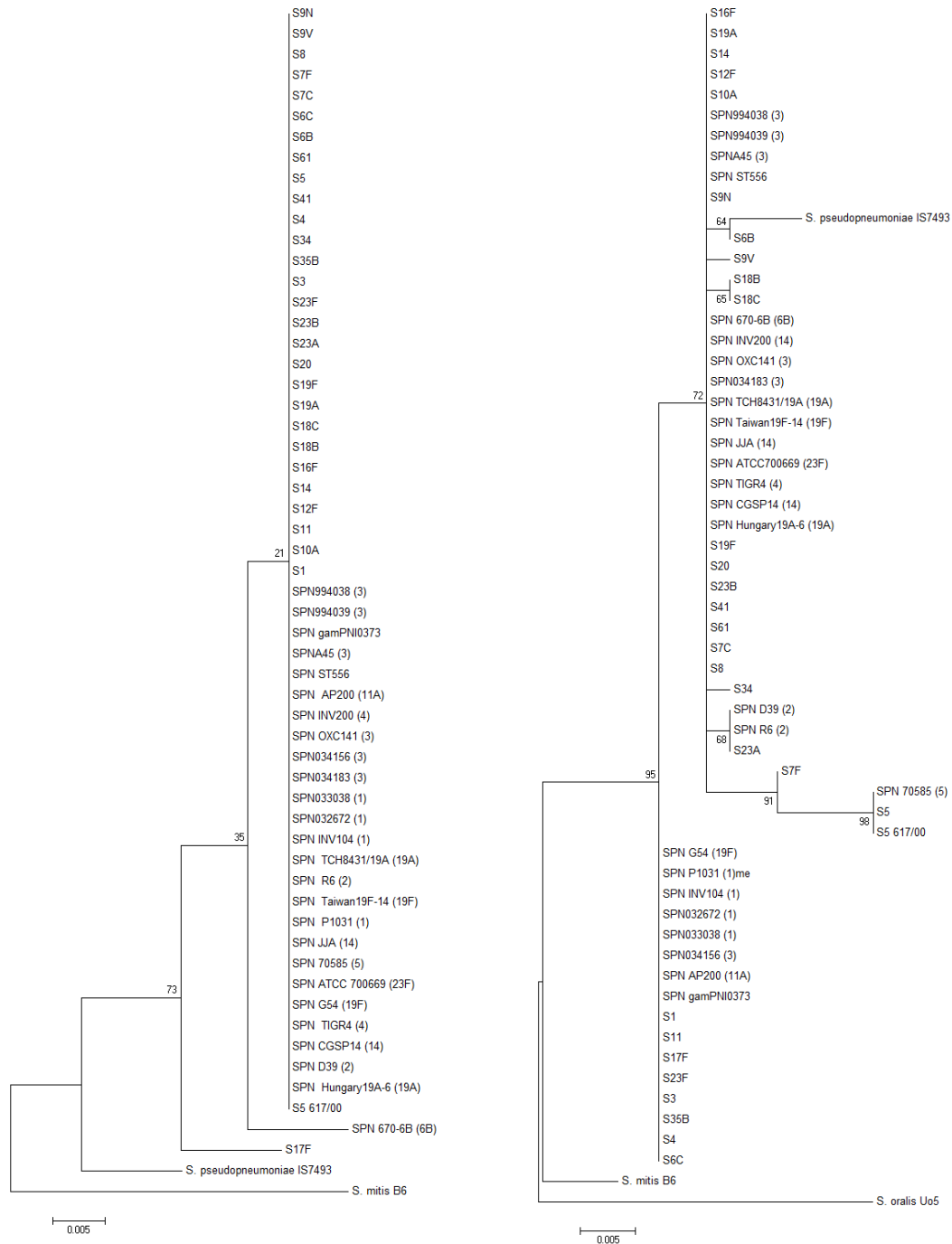


Figura 2: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 00271 e 00589 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

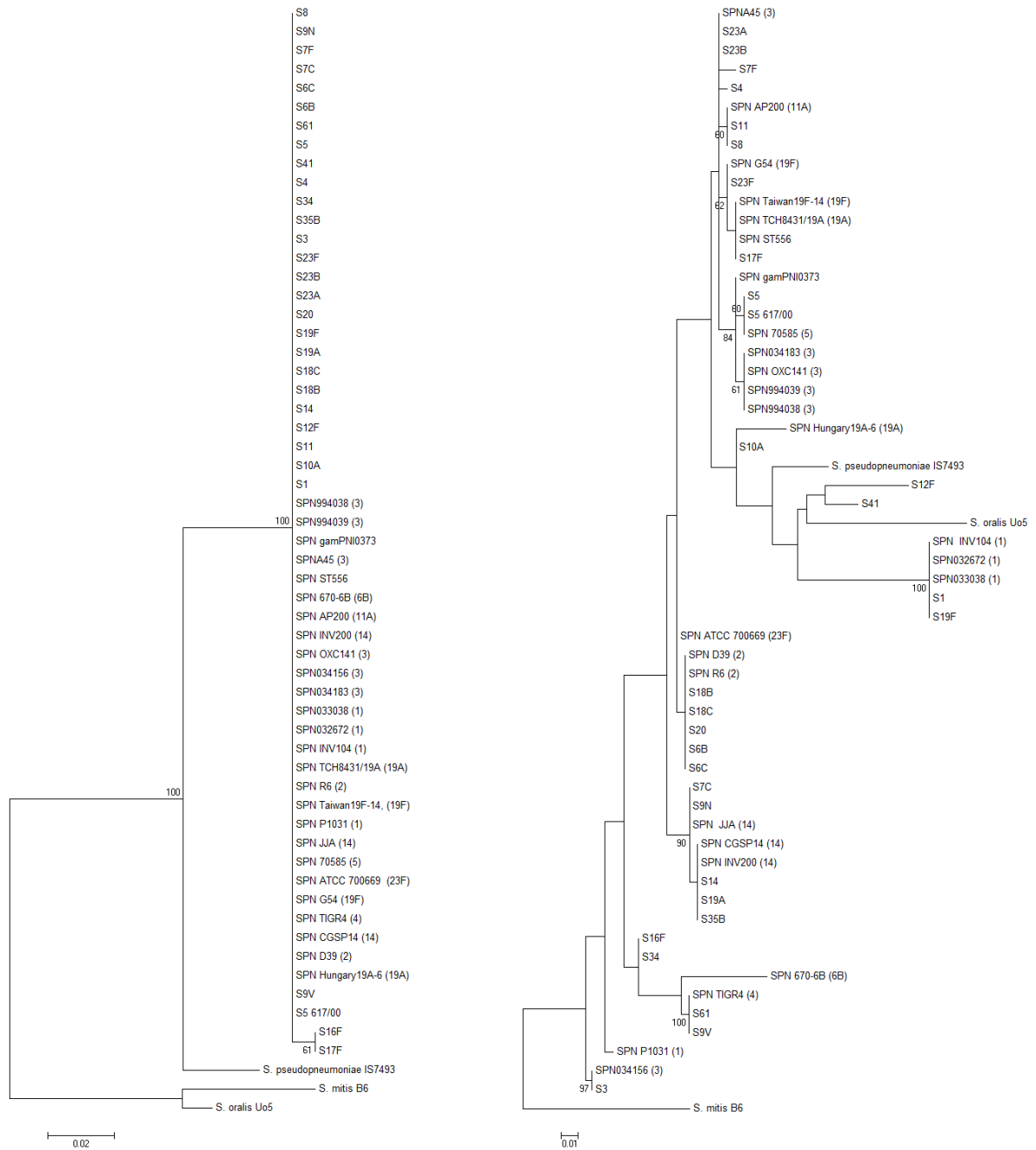


Figura 3: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 00962 e 01065 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

01195

01909

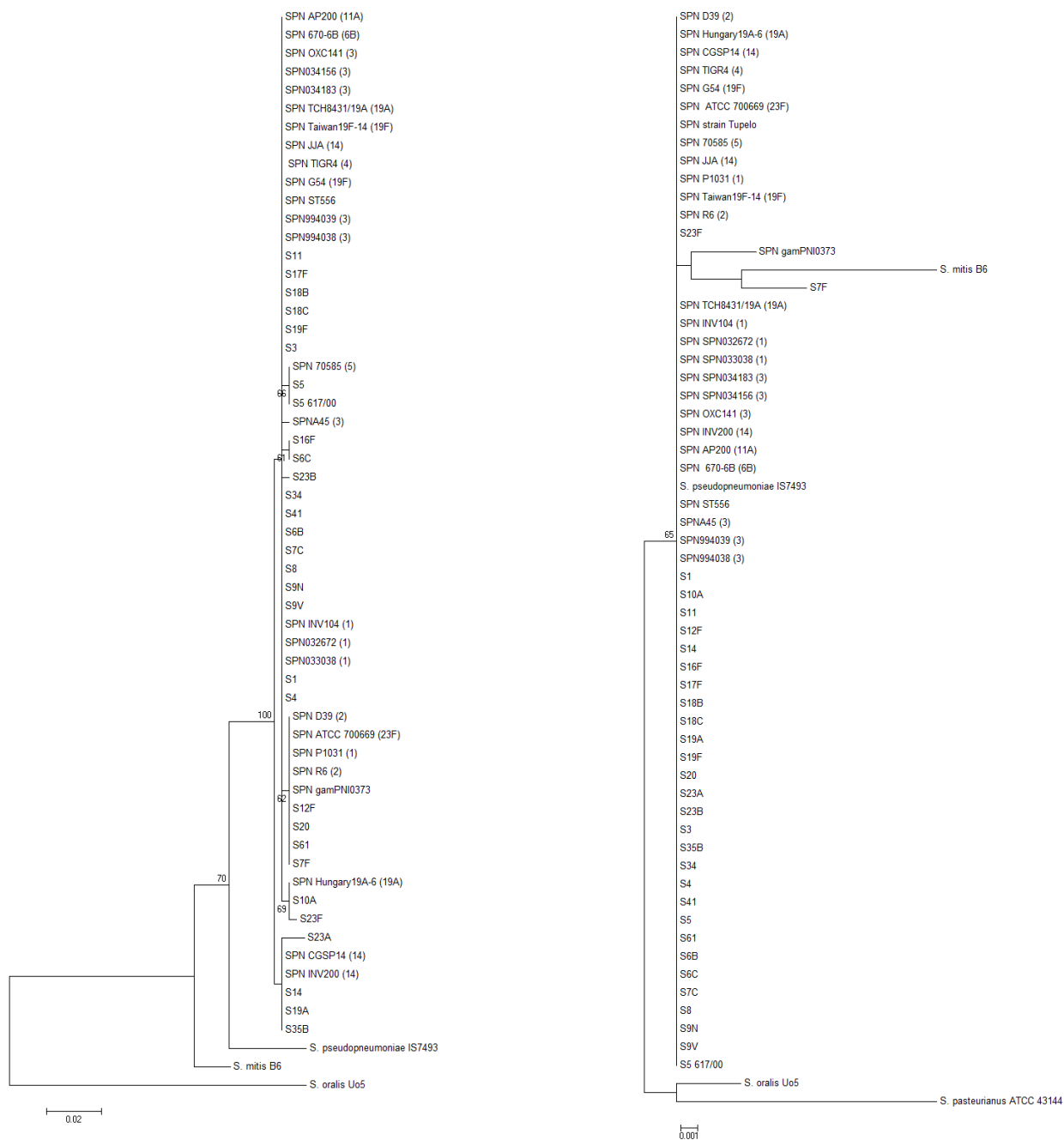


Figura 4: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 01195 e 01909 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

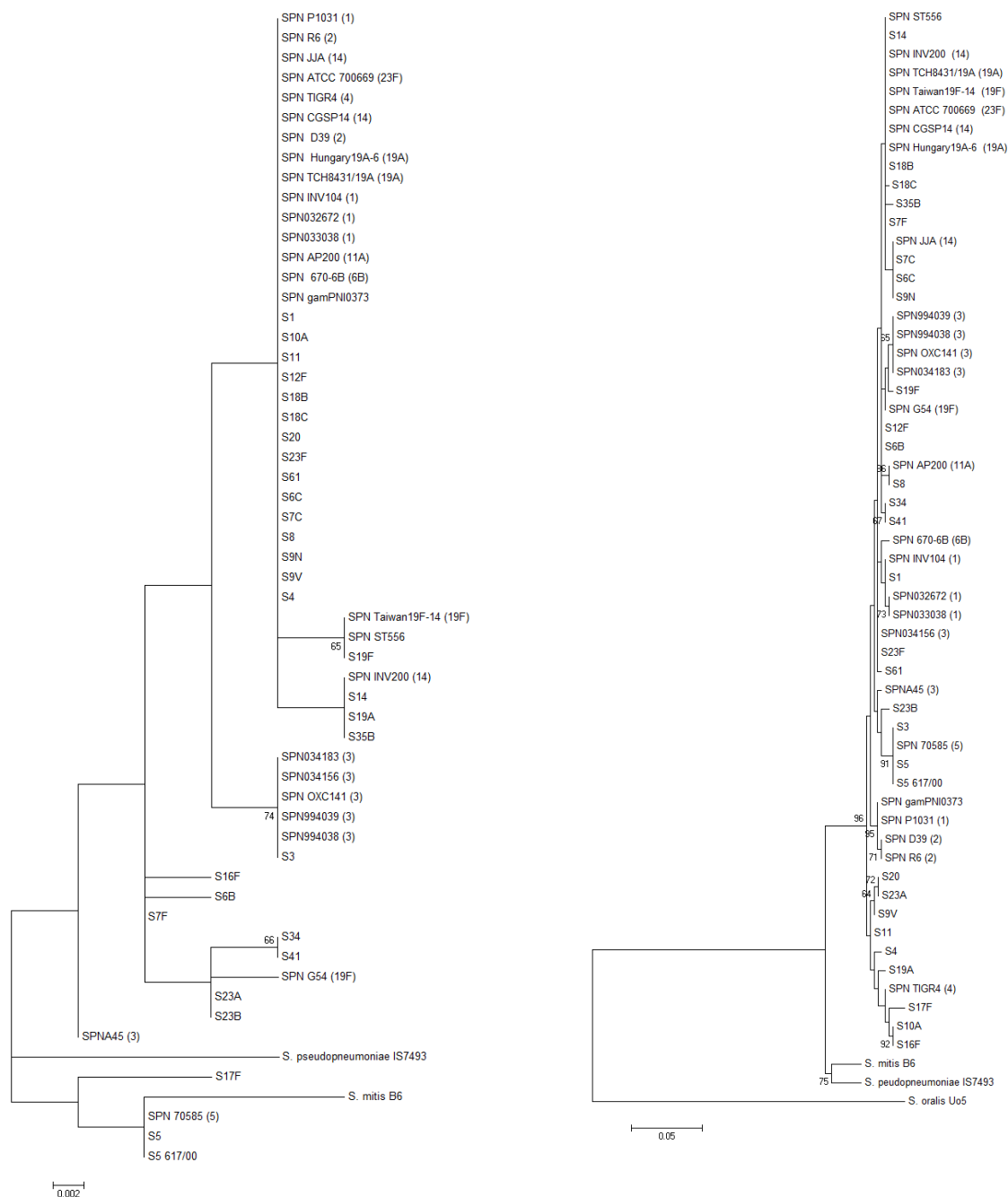


Figura 5: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 01929 e 01967 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

02009

02072

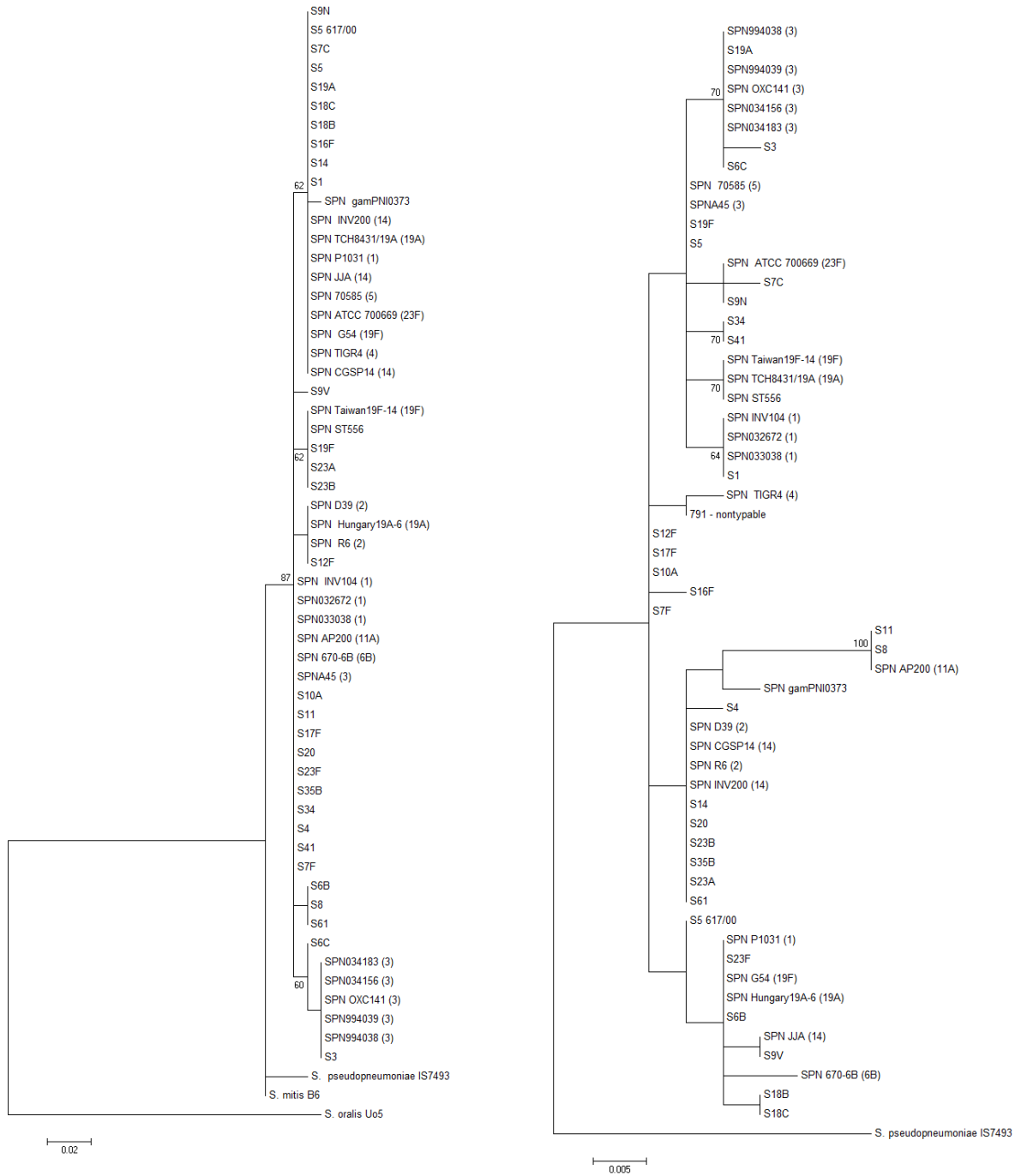


Figura 6: Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos das seqüências de aminoácidos das proteínas 02009 e 02072 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

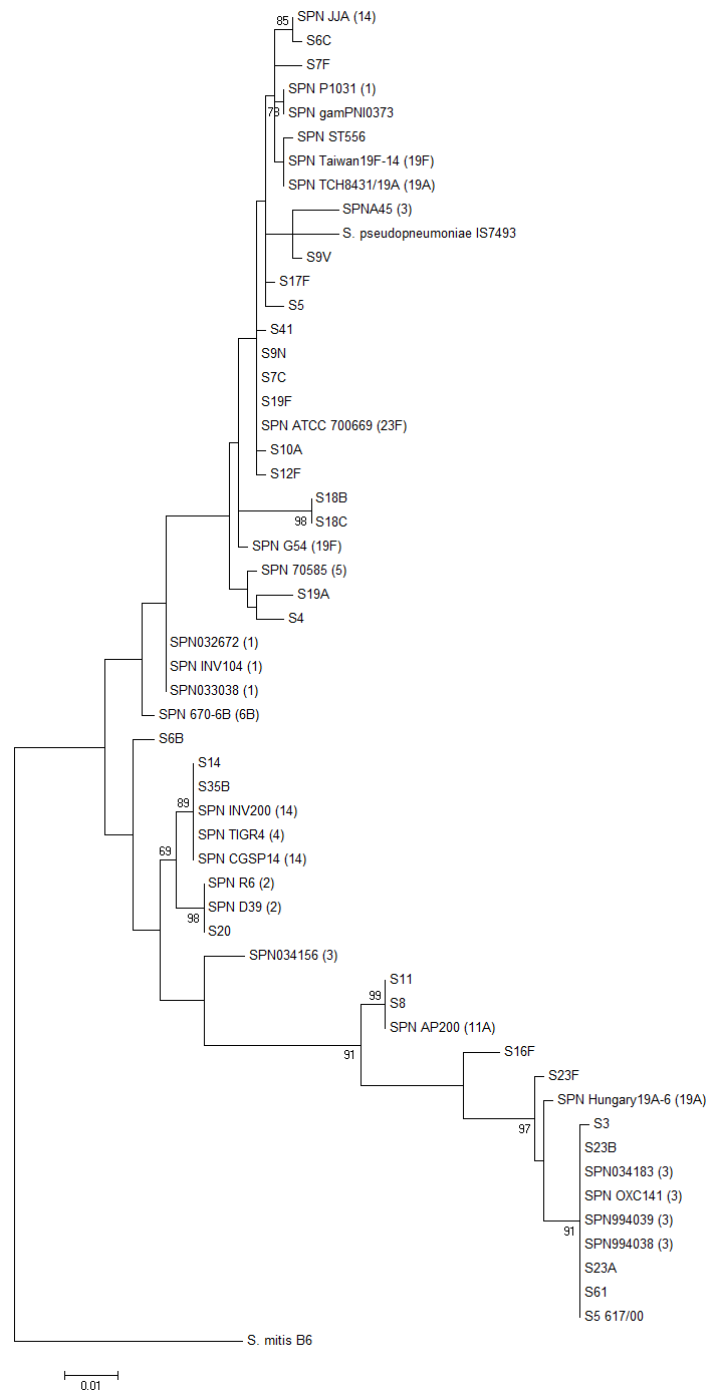


Figura 7: Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína 02232 mostrando a relação filogenética entre as amostras de *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* examinadas neste estudo.

Anexo 14: Padrões de tamanho e peso molecular

No presente trabalho foi utilizado o padrão de tamanho molecular (para DNA) “1 Kb DNA ladder” (Life Technologies) na quantidade de 10 μ L, correspondendo a concentração de 0,5 μ g de DNA. Os padrões de peso molecular (para proteína) utilizados foram “Bench Mark Prestained Protein Ladder” e o “Bench Mark Protein Ladder” (Life Technologies), na quantidade de 10 μ L cada.