



Universidade do Minho

Escola de Engenharia
Departamento de Informática
Mestrado Bioinformática

Algoritmos para Análise de Sequências Biológicas
e
Laboratórios de Bioinformática

Trabalho Prático

Neisseria gonorrhoeae

Grupo 3

PG 28477 Diana Lemos

PG 24094 Joana Ferreira

PG 27658 Susana Gomes

Braga, Fevereiro de 2015

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	4
Análise de literatura	5
Conhecer melhor o organismo	5
Crescimento	6
Hospedeiro e infeção	6
Fatores de virulência e patogenicidade	6
Transmissão	7
Tratamentos	8
Antibióticos	9
Bases de Dados	12
KEGG	12
UniProt	12
Scripts desenvolvidos para pesquisas na Uniprot	13
Psort	13
Grau de Revisão	14
Scripts desenvolvidos	17
Alinhamento múltiplo e Filogenia	18
Proteína: YP_207698.1	18
Proteína: YP_207697.1	20
Targets	22
Código e utilizador	24
CONCLUSÃO	25
BIBLIOGRAFIA	26
WEBGRAFIA	26

Índice de Figuras

Figura 1 - zona atribuída.....	4
Figura 2 - Neisseria Gonorrhoeae	5
Figura 3 - Descrição do processo de transmissão da Neisseria gonorrhoeae.....	8
Figura 4 - Informação retirada do KEGG sobre o gene com locus tag NGO0526.....	12
Figura 5 - Alguma da informação retirada da UniProt sobre o gene com locus tag NGO0526. .	12
Figura 6 - Análise da localização celular da proteína originária do gene com locus tag NGO0566 a partir da ferramenta Psort.	13
Figura 7 - Análise Psort da proteína correspondente do gene com locus tag NGO0559..	14
Figura 8 - BLASTp do gene de locus tag NGO0718, feito a partir do NCBI.....	15
Figura 9 - BLASTp do gene de locus tag NGO0718, feito a partir do NCBI. (cont.)	16
Figura 10 - análise das funções da proteína mais semelhante a partir da UniProt.	16
Figura 11 - BLASTp da proteína correspondente ao gene de locust tag NGO0608.	17
Figura 12 - BLASTp da proteína correspondente ao gene de locust tag NGO0608. (cont.).....	17
Figura 13 - Resultados da ferramenta Blastp para a proteína YP_207698.1.	18
Figura 14 – Árvore Filogenética.....	19
Figura 15 - Resultados do Blastp	20
Figura 16 - Árvore filogenética	20
Figura 17 - Base de dados Uniprot para a proteína Q6LOS6.1.	21
Figura 18 - Base de dados Uniprot para a proteína P63969.1.	21
Figura 19 – Genes essenciais e homólogos não-humanos.....	23
Figura 20 - Menu principal.	24
Figura 21 - Menu de pesquisa de artigos.	24

INTRODUÇÃO

Este relatório foi realizado no âmbito de avaliação em grupo para as unidades curriculares de Algoritmos para Análise de Sequências Biológicas e de Laboratórios de bioinformática. Tem como objetivo a caracterização funcional de genes de uma determinada zona do genoma da bactéria *Neisseria gonorrhoeae* a partir de ferramentas bioinformáticas estudadas e aplicadas nas aulas das referidas unidades curriculares.

Para a realização deste relatório foi-nos destinada a zona do genoma da bactéria entre os genes *NGO0487* e *NGO0727*, o que corresponde a cerca de 200 genes. Assim, começou-se por fazer uma abordagem introdutória a nível da análise de artigos publicados sobre a bactéria em questão. Posteriormente, fez-se uma descrição mais detalhada de todo o processamento de informação recolhida pelas várias ferramentas bioinformáticas utilizadas.

Grupo de trabalho	Genes (locus tag)	Zona do genoma
1	NGO0001 a NGO0242	1 a 246000
2	NGO0243 a NGO0485	246001 a 468400
3	NGO0487 a NGO0727	468401 a 727400
4	NGO0729 a NGO0970	727401 a 942520
5	NGO0971 a NGO1212	942521 a 1162600
6	NGO1213 a NGO1455	1162601 a 1422700
7	NGO1456 a NGO1700	1422701 a 1657900
8	NGO1701 a NGO1940	1657901 a 1917220
9	NGO1941 a NGO2182	1917221 a 2153922

Figura 1 - zona atribuída

Análise de literatura

Conhecer melhor o organismo

A ***Neisseria gonorrhoeae*** ou Gonococo é uma bactéria gram negativa, do filo *Proteobacteria*, classe *Beta Proteobacteria*, ordem *Neisseriales*, família *Neisseriaceae* e género *Neisseria*. Das onze espécies de *Neisseria* que colonizam os seres humanos, apenas duas são patogénicas. A *Neisseria gonorrhoeae* trata-se de uma dessas bactérias patogénicas que provoca a doença designada por gonorreia.

O organismo é oval com cerca de $0,6\ \mu\text{m}$ a $1,0\ \mu\text{m}$ de diâmetro e é normalmente observado aos pares. *N. gonorrhoeae* também é optimamente cultivada entre 35°C e 36°C em *agar Thayer - Martin* e outros meios que contêm 10 % de dióxido de carbono (o que sugere que a espécie é “capnophilic”) e só oxida a glucose. Este agente patogénico também possui fímbrias (pili) que se estendem por vários micrómetros (μm) a partir da sua superfície e opera mecanicamente semelhante a um gancho, permitindo que as bactérias adiram às superfícies. São frágeis, morrem rapidamente no ambiente, e o único hospedeiro conhecido é o ser humano.

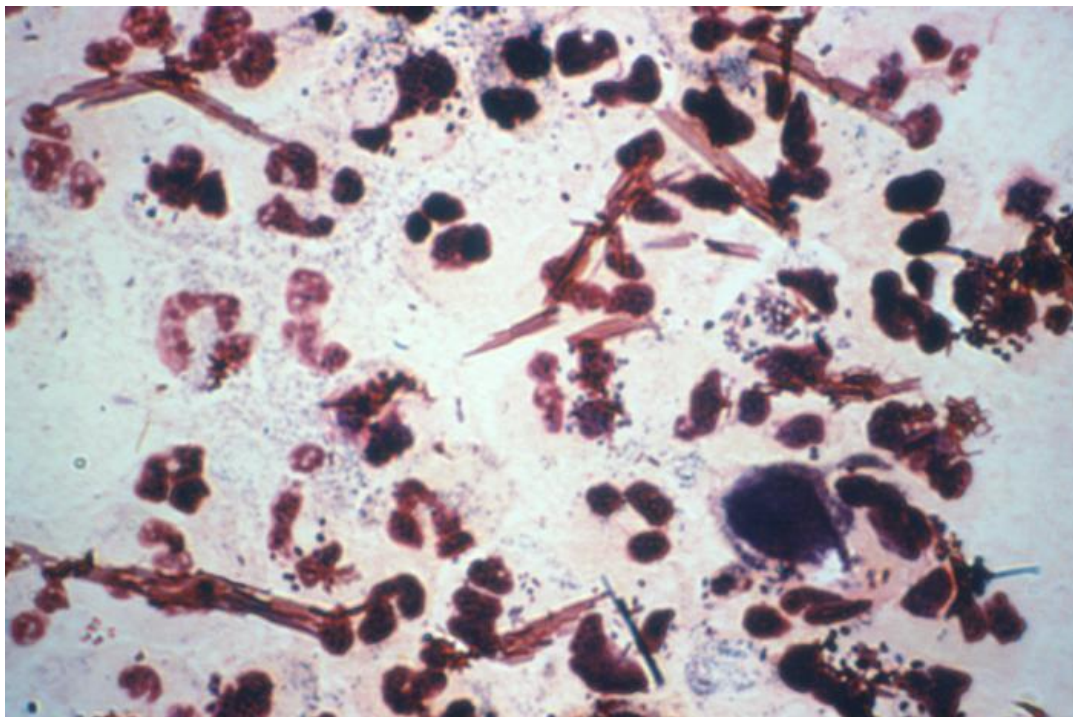


Figura 2 - *Neisseria Gonorrhoeae*

Crescimento

A *Neisseria*, em laboratório, é geralmente isolada no *Thayer-Martin agar* (agar ou VPN) que se trata de uma placa de agar que contém antibióticos (vancomicina, colistina, nistatina, e trimetoprim) e nutrientes que facilitam o crescimento de espécies de *Neisseria*, inibindo o crescimento de bactérias e fungos contaminantes.

Hospedeiro e infecção

A *N. gonorrhoeae* tem proteínas denominadas proteínas de superfície de *Opa* que se ligam aos recetores das células. Dessa maneira é capaz de impedir uma resposta imune por parte do hospedeiro, sendo este incapaz de desenvolver uma memória imunológica o que significa que uma nova infecção seja possível no futuro.

Este organismo também pode “enganar” o sistema imunitário através de um processo chamado variação antigénica, em que a bactéria é capaz de alterar os determinantes antigénicos (locais onde os anticorpos se ligam), tais como as proteínas *Opa* e do *Tipo IV pili* que se encontram na sua superfície. As muitas permutações das proteínas da superfície tornam mais difícil o reconhecimento e a defesa da bactéria por parte das células do sistema imunológico.

Fatores de virulência e patogenicidade

Existem quatro tipos diferentes de resistência desta espécie, nomeadamente T1, T2, T3, T4 que são classificadas pelas suas **fímbrias**. As suas membranas externas são compostas por proteínas, fosfolípidos, e lipopolissacarídeos (LPS). Os lipopolissacáridos do organismo *N. gonorrhoeae* são diferentes daqueles encontrados em bactérias entéricas, porque estes são oligossacarídeos basais altamente ramificados e não possuem as subunidades de repetição do O-antigénio. Assim, o LPS da *Neisseria* é referido como **lipo-oligossacárido** (LOS). Durante o seu crescimento, liberta os fragmentos da membrana externa conhecidos como “bolhas”, sendo estas vesículas que contêm o LOS, que se pensa ter um papel na patogénese durante o seu processo de infecção.

As paredes celulares da *N. gonorrhoeae* contêm proteínas que residem na superfície da membrana externa ou atravessam a membrana exterior (proteínas integrais). As bactérias utilizam estas proteínas da membrana externa e as suas fímbrias para invadir o hospedeiro.

Primeiro, estas bactérias utilizam as suas fímbrias para se fixarem nas células epiteliais não ciliadas da trompa de Falópio, e depois entram nas células epiteliais por endocitose. Durante todo o processo de endocitose, a membrana da célula puxa e aperta um vacúolo ligado à membrana que tem as bactérias no interior da mesma. Este vacúolo desloca-se para a base da célula de modo a que as bactérias possam

ser libertadas para o tecido subepitelial e dessa maneira pode causar, com sucesso, uma infecção no hospedeiro.

Uma vez dentro do hospedeiro, a bactéria produz dois tipos de proteases **IgA** extracelulares que possuem a capacidade de clivar diferentes áreas da região dobradiça das moléculas de cadeia pesada da imunoglobulina humana. O dano celular é causado pela libertação de LOS e do peptidoglicano, que ativam a via alternativa do complemento e a produção do fator de necrose tumoral.

A virulência pode ficar comprometida caso o microrganismo sofra alterações estruturais de superfície.[7]

Transmissão

A *Neisseria gonorrhoeae* é adquirida através do contacto sexual e estabelece a infecção no trato urogenital, interagindo com as células epiteliais não ciliadas, resultando na invasão celular. Apesar dos diferentes mecanismos moleculares envolvidos durante o estabelecimento da bactéria nas superfícies mucosas masculinas e femininas, a infecção leva muitas vezes à inflamação e ao afluxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN). No entanto, a infecção do trato genital inferior feminino é geralmente assintomática. As *N. gonorrhoeae* tragadas por PMN são secretadas no exsudato rico em PMN. Tanto o fator de necrose tumoral (TNF) de fagócitos como os produtos gonocócicos, tais como o peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS), também causam danos tóxicos às células epiteliais ciliadas das superfícies mucosas. ECM é a matriz extracelular [2].

A imagem a seguir apresentada, representa a descrição do processo de transmissão da *Neisseria gonorrhoeae*:

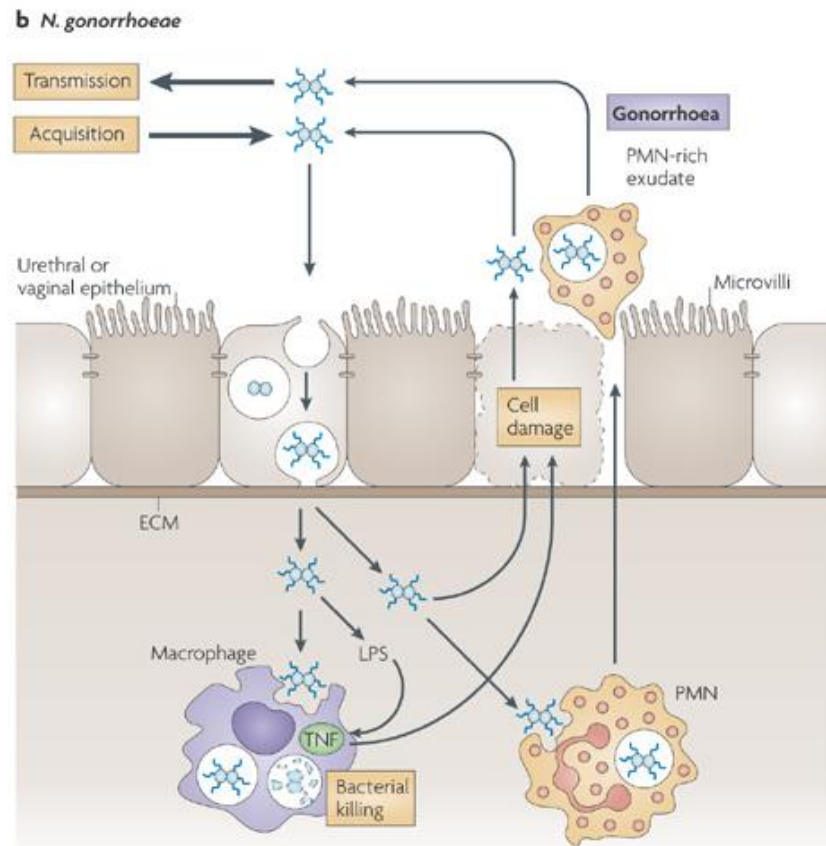


Figura 3 - Descrição do processo de transmissão da *Neisseria gonorrhoeae*.

Aproximadamente 45% das mulheres infetadas apresentam uma infecção *gonococcal* ascendente e subsequente PID (*Pelvic Inflammatory Disease*). A PID é frequentemente a causa de infertilidade e gravidez etópica devido ao bloqueio permanente das trompas de Falópio. A infecção nos homens leva a uretrite, epididimite, e prostatite [6].

Tratamentos

Se a *N. gonorrhoeae* é resistente aos antibióticos da família da penicilina, então recorre-se muitas vezes aos antibióticos ceftriaxone (cefalosporina de terceira geração). Estes, assim como outros beta lactâmicos interrompem a síntese de peptidoglicano (confere rigidez à parede celular das bactérias).

Dentro da *N. gonorrhoeae* existem genes que conferem resistência a cada um dos antibióticos utilizados para curar a gonorreia, mas até agora não co-existem dentro de um único *gonococcus*. No entanto, devido à alta afinidade para a transferência horizontal de genes da *N. gonorrhoeae*, a gonorreia com resistência a antibióticos é vista como uma ameaça emergente da saúde pública.

Apesar das descobertas que indicam que as fluoroquinolonas têm taxas de cura semelhantes às da ceftriaxona, a *N. gonorrhoeae* tornou-se cada vez mais resistente às *fluoroquinolonas* em algumas áreas geográficas. Portanto, o CDC

(Centro de Controle e Prevenção de Doenças) não aconselha o uso de fluoroquinolonas para tratar a infecção em pacientes que vivem ou possam ter adquirido a infecção na Ásia, nas ilhas do Pacífico e Califórnia. O CDC observou recentemente um aumento substancial de *N. gonorrhoeae* resistentes a fluoroquinolonas em homens que têm relações sexuais com outros homens e já não recomenda fluoroquinolonas como tratamento de primeira linha nestes pacientes. Na Inglaterra, no País de Gales e no Canadá também relataram casos de *N. gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolonas.[9]

Antibióticos

Os antibióticos são fármacos utilizados para tratar infecções bacterianas, matando ou inibindo o crescimento dos microrganismos. São capazes de inibir em baixas doses, processos vitais das bactérias. (KESTER et al, 2008). O antibiótico age sobre o mecanismo de construção da parede celular da bactéria, deixando as células humanas intactas.

Uma compreensão abrangente da prevalência da diminuição da sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro (ESCds) e os tipos de sequência (ST) de deformações de *N. gonorrhoeae* em circulação nas populações de pacientes, podem ajudar a orientar as decisões chave para o planejamento da gestão da *N. gonorrhoeae*.

Vários estudos têm mostrado que a acumulação de mutações nos genes cromossômicos pode conduzir ao fenótipo de ESCds. Os genes estudados incluem *penA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina 2 (PBP 2); *porB1*, que codifica uma proteína de membrana externa do canal relacionada com a entrada dos antibióticos; *ponA*, que codifica PBP 1; *pilQ*, que codifica a secretina PilQ da membrana externa; e *mtrR*, um repressor da bomba de efluxo MTRC - MtrD - MtrE. Polimorfismos no alelo *penA* foram significativamente associados com as ESCds na *N. gonorrhoeae*. PBP 2 é uma enzima ligada à membrana envolvida na síntese da parede celular e em mutações em posições diferentes podem resultar em diferentes graus de aumento de MICs. Vários estudos têm sugerido que as estirpes resistentes são em grande parte clonadas e contêm padrões em mosaico de PBP 2 específicos, como o tipo XXXIV. A sequência do tipo 1407, com base nos genes *por* e *tbpB*, também tem sido associada com as ESCds [1].

A infecção da *Neisseria gonorrhoeae* é uma das causas mais comuns de uretrite na Polónia. A resistência das bactérias a uma ampla gama de antibióticos, incluindo a *ciprofloxacina*, torna mais difícil o tratamento da gonorreia. O mecanismo de ação da *ciprofloxacina* depende da inativação bacteriana da *topoisomerase II* (girase) e da *topoisomerase IV*. A resistência à *ciprofloxacina* que ocorre na *Neisseria gonorrhoeae* deve-se principalmente a mutações em genes bacterianos *gyrA* (codificação topoisomerase II) e/ou *parC* (codificação topoisomerase IV). O nível de resistência elevado é um efeito da combinação de três ou quatro mutações. Outro mecanismo menos importante da resistência à *ciprofloxacina*, que pode coexistir com as mutações nos genes *gyrA* e *parC* está relacionado ao excesso de produção de bombas de proteínas membranares [2].

A *Neisseria gonorrhoeae* pode desenvolver rapidamente resistência aos agentes antimicrobianos. Ao longo dos últimos anos, a diminuição da sensibilidade

gonocócica às cefalosporinas de terceira geração, especialmente à cefixima, surgiu em todo o mundo. Portanto, as orientações internacionais atuais recomendam o tratamento duplo para a gonorreia, com a ceftriaxona mais a azitromicina ou a doxiciclina.

Foram testados um total de 320 isolados. Entre 1990 e 2006, todas as amostras testadas foram suscetíveis às dois cefalosporinas. Subsequentemente, a prevalência de MICs elevadas para a cefixima aumentou para 10,4% (2007/2008), 11,5% (2009/2010), e 11,4% (2011/2012); e para a ceftriaxona aumentou 2,4% (2007/2008), 4,7% (2009/2010), e 0% (2011/2012), respectivamente. A prevalência da resistência à ciprofloxacina (72,7%) e à penicilina (22,7%) foi elevada em 2011/2012.

A diminuição da susceptibilidade da *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas de terceira geração na Suíça apoia as recomendações de tratamento com a ceftriaxona mais a azitromicina ou a doxiciclina. Os profissionais de saúde precisam estar cientes das possíveis falhas no tratamento com cefalosporinas. A supervisão contínua da resistência antimicrobiana gonocócica é essencial [3].

A incidência estimada de novos casos de gonorreia está a aumentar e o perfil de resistência antimicrobiana da *N. gonorrhoeae* está a piorar. A recente e mais significativa descoberta foi o surgimento da *N. gonorrhoeae* XDR (extensively drug-resistant) caracterizada por concentrações inibitórias mínimas muito altas de ceftriaxona. Uma mudança nacional de cefixima para ceftriaxona em altas doses, como tratamento antigonococcal de primeira linha na Inglaterra e no País de Gales, bem como partes do Japão, foi acompanhada por uma redução na prevalência de gonococci resistente a ESC oral. A azitromicina administrada em conjunto com gentamicina ou gemifloxacina tem-se mostrado ser um tratamento antigonococcal alternativo eficaz. Tanto *ertapenem* como *solithromycin* têm boa atividade *in vitro* contra estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes a ESC [4].

Descrição do trabalho elaborado

O primeiro passo foi criar um *script* que acede ao ncbi e guarda num ficheiro *genbank* a zona do genoma correspondente. De maneira a verificar se a informação retirada é realmente a pretendida, foi feito um *script* que compara a informação dos genes presentes na zona e os genes anotados numa tabela do ncbi. É de notar que devido a diferença nas localizações dos genes, a validação da tabela não é a pretendida. Por essa razão esse *script* não está a ser usado.

Sendo o objetivo deste trabalho a caracterização dos genes da zona do genoma atribuída, foi gerada uma tabela automaticamente, por meio de scripts em *biopython*, onde apresenta *locus tag* de cada gene, o seu *Gene ID*, a sua *localização* no genoma, *accession number* e *proteínas* resultantes, para cada gene na base de dados da *NCBI*.

Para gerar essa tabela foram feitos scripts em *python* para extrair a informação das *features* dos genes tipo *CDS*.

Posteriormente completou-se essa mesma tabela com a seguinte informação: grau de revisão, número de aminoácidos da proteína resultante de cada gene, *EC Number*, *KEGG Orthologs*, *KEGG pathways*, Celular Location, Função, *GeneOntology (GO)*, descrição e alguns comentários pertinentes. Para a recolha dessa informação recorreu-se a bases de dados como *KEGG*, *Psort* e *Uniprot*.

Bases de Dados

Para completar a tabela dos genes com informação sobre os mesmos foram feitas pesquisas em várias bases de dados. Essa pesquisa foi maioritariamente manual.

KEGG

Nesta base de dados a partir do *locus tag* de cada gene retirou-se informação referente ao tamanho da proteína produzida, *EC Number*, *KEGG Orthologs* e *KEGG pathways*.


 Neisseria gonorrhoeae FA 1090: NGO0526 Help			
Entry	NGO0526	CDS	T00237
Definition	phosphoribosylaminoimidazole synthetase (EC:6.3.3.1)		
Orthology	K01933 phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase [EC:6.3.3.1]		
Organism	ngo Neisseria gonorrhoeae FA 1090		
Pathway	ngo00230 Purine metabolism ngo01100 Metabolic pathways ngo01110 Biosynthesis of secondary metabolites		
AA seq	344 aa AA seq DB search MSTSLSYRDAGVGIDAGDQLVEIKPFKRTMRPEVLGDLGGFGALVEIGKKYQNPVLVS GTDGVGTLKLAFDWDKHDTVGIDLVAMSVNDILVQGAELFFLDYFACGKLDVPRATDV IKGIAQGCEESGALIGGETAEMPGMYPVGEYDLAGFAGVVEKENVITGLSIGAGDVVL GLASNGAHSNGYSLIRKIIERDNPDLDAEFDNGKTLREAVIAPTRLVYVKPILAALEKFTI KGMHITGGGITENVPRVLPKNTVAQIDAESWELPKLFQWLQKAGNVETQEMYRTFNCGI GMVVIVAAEDADAVRSFLSGQGETVYRLGCIRERQGNHQQTQVA		

Figura 4 - Informação retirada do KEGG sobre o gene com locus tag NGO0526.

UniProt





Nesta base de dados retirou-se a restante informação para completar a tabela, ou seja, o grau de revisão, Celular Location, Função, *GeneOntology* (GO) e descrição. Os comentários foram também baseados na informação retirada a partir desta base de dados.

Q5F973 - PUR5_NEIG1



Protein | **Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase**

Gene | **purM**


Organism | *Neisseria gonorrhoeae* (strain ATCC 700825 / FA 1090)

Status | Reviewed - Annotation score:     - Protein inferred from homology¹

Subcellular location¹

Cytoplasm  UniProt annotation 

GO - Cellular component¹

► cytoplasm  Sources: UniProtKB-SubCell

[Complete GO annotation...](#)

Keywords - Cellular component¹

Cytoplasm

Figura 5 - Alguma da informação retirada da UniProt sobre o gene com locus tag NGO0526.

Scripts desenvolvidos para pesquisas na Uniprot

Com a ferramenta *Biopython* foi desenvolvido um script onde é possível obter os IDs do *Uniprot* para a pesquisa das proteínas. Neste código, o utilizador insere o valor *acession* (presente na tabela de genes) e obtém o respetivo valor ID do uniprot, com esse valor é feita a pesquisa para o restante código.

Também é possível obter a informação de determinada proteína num ficheiro e também qual a revisão da mesma, ou seja, se é *reviewed* ou *unreviewed*.

Psort

Por vezes a localização celular não é fornecida pela *UniProt*, assim é necessário recorrer a outros meios.

Para determinação da localização celular da proteína, produzida a partir de um determinado gene de interesse, recorreu-se à *Psort*. Esta ferramenta recebe informação de uma sequência proteica e a sua *táxon* de origem (se provém de bactérias gram positivas ou negativas) e informa qual a probabilidade de determinada proteína estar localizada em cada local com alguma informação adicional.

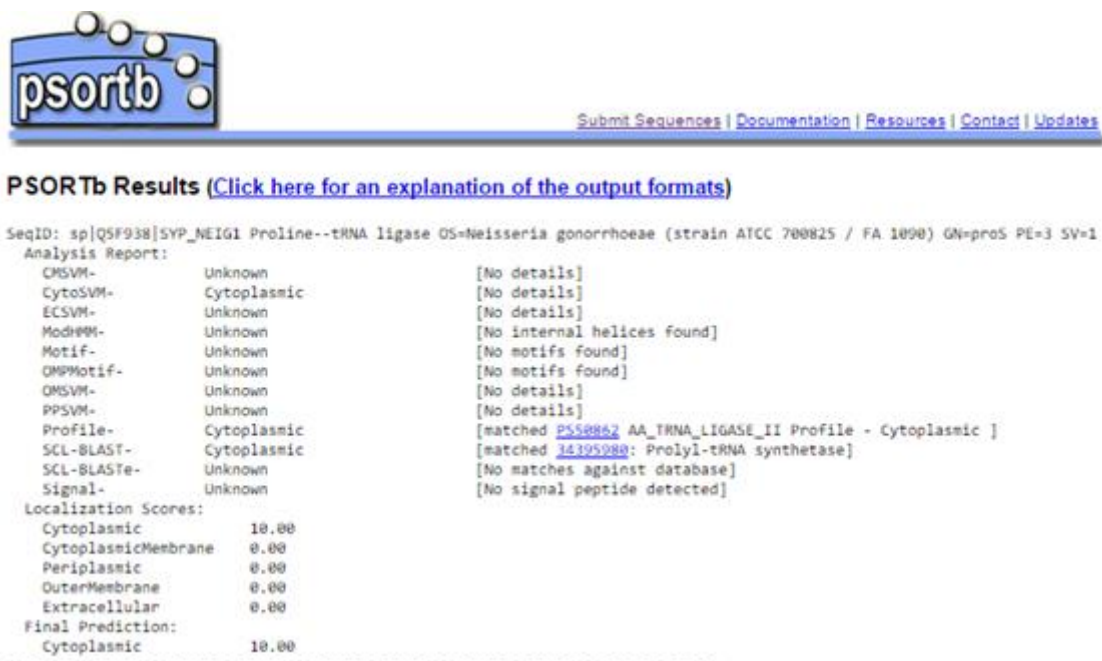


Figura 6 - Análise da localização celular da proteína originária do gene com locus tag NGO0566 a partir da ferramenta Psort.

No caso da imagem anterior, conclui-se rapidamente que a proteína se encontra no citoplasma da célula visto que o *localization score* é maximo nesse local.

Contudo, por vezes, nem mesmo o *Psort* disponibiliza uma informação exata sobre a localização de determinadas proteínas, como é o caso da proteína do gene *NGO0559*, como mostra a imagem seguinte. Nestes casos teve de se considerar localização desconhecida.

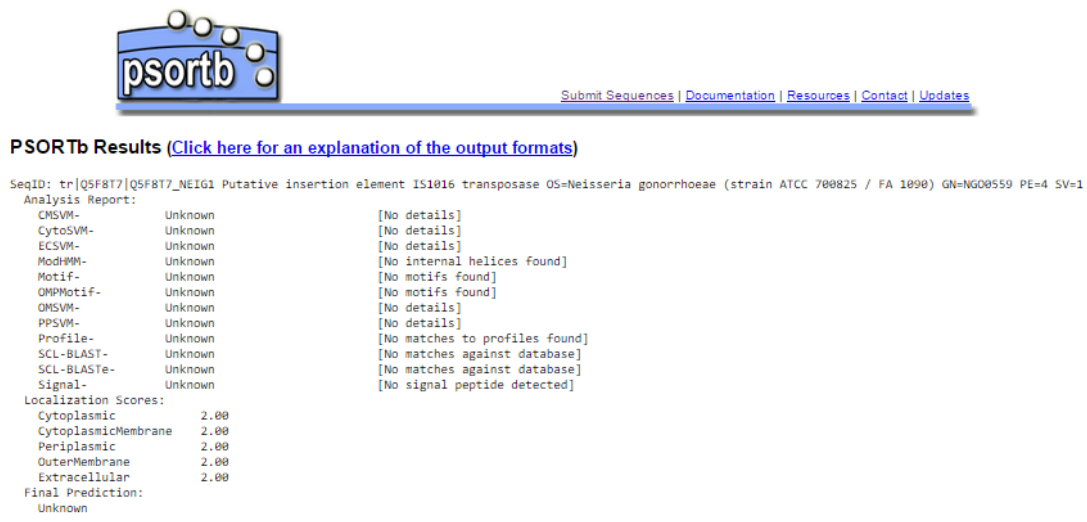


Figura 7 - Análise Psort da proteína correspondente do gene com locus tag NGO0559.

Grau de Revisão

O grau de revisão de cada gene foi um fator crucial para o preenchimento desta tabela, uma vez que quando um gene é *Unreviewed* é necessário proceder-se a uma análise mais cuidada do mesmo. Nestes casos o algoritmo *BLAST* é essencial.

Neste projeto, dos 211 genes/proteínas a analisar, apenas 34 são reviewed (segundo a base de dados *Uniprot*).

BLAST

O algoritmo *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) permite comparar informações de sequências biológicas (proteicas ou de DNA), ou seja, uma sequência fornecida é comparada com uma biblioteca de sequências de forma a identificar quais as que mais apresentam maior grau de semelhança à sequência de interesse. Esse grau de semelhança determina-se por análise de alguns valores, como *e-values* e a *query cover*.

Assim, a partir do momento que um gene é *Unreviewed* toda a restante informação, que ainda é desconhecida, será provavelmente similar a um outro gene com grau de semelhança bastante elevado relativamente ao gene de interesse.

No caso da figura seguinte realizou-se um *BLASTp*, ou seja, realizou-se um *BLAST* usando a sequência proteica do gene de interesse. Analisando os resultados pode-se verificar que os dois primeiros *hits* são os que apresentam melhor *query cover* com a sequência submetida. Embora o segundo *hit* tenha maior área de semelhança com a proteína de interesse considerou-se o primeiro *hit* como sendo o de maior grau de semelhança, uma vez que apresenta melhor *e-value* do que o segundo.

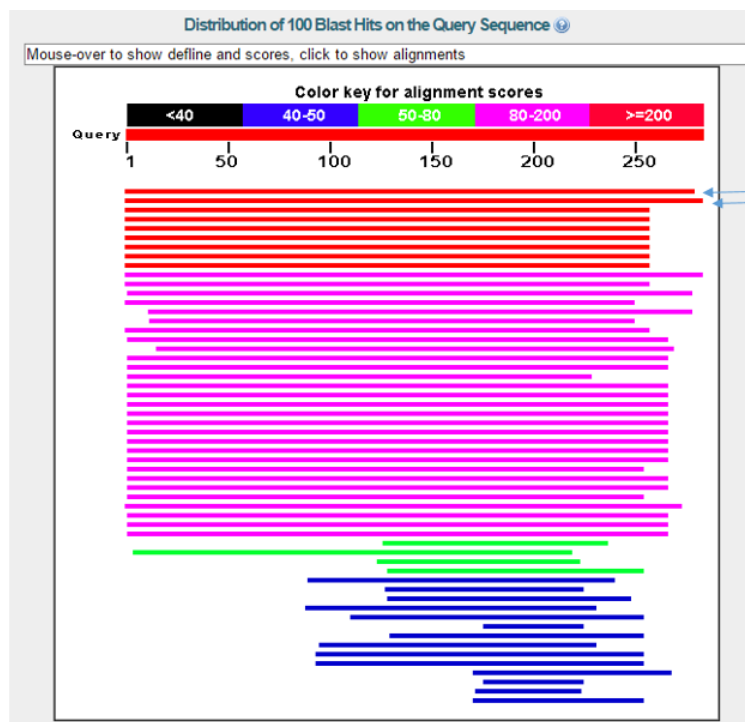


Figura 8 - BLASTp do gene de locus tag NGO0718, feito a partir do NCBI.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments: Unaligned - GenPlot - Graphics - Distance tree of results - Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=HTH-type transcriptional regulator HsuR; AltName: Full=Hex regulon repressor [Escherichia coli K-12]	211	211	98%	5e-65	41%	P46118.2
RecName: Full=HTH-type transcriptional regulator HsuR [Pseudomonas putida KT2440]	207	207	100%	2e-63	40%	Q88P32.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	211	211	90%	8e-62	44%	Q18YAT.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	211	211	90%	1e-61	44%	Q18YQ1.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	210	210	90%	3e-61	44%	Q25YAS.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	209	209	90%	4e-61	44%	Q3JPP0.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	209	209	90%	4e-61	44%	Q63927.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	209	209	90%	6e-61	44%	Q62H08.1
RecName: Full=Bifunctional protein gln; Includes: RecName: Full=Glucokinase; AltName: Full=Glucose kinase; Includes: RecName: Full=Putative HTH-type transco	208	208	90%	2e-60	44%	Q143F8.1
RecName: Full=HTH-type transcriptional regulator HsuR; AltName: Full=Hex regulon repressor [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	195	195	100%	7e-59	39%	Q08283.2
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator TTE6211 [Thermoplasma volcanium MB4]	150	150	90%	1e-41	35%	Q68036.1
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator CA_G0191 [Candida albicans ATCC 6257]	145	145	97%	5e-40	34%	Q67865.1
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator H_0143 [Haemophilus influenzae Rd KW20]	142	142	88%	1e-38	33%	P44540.2
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YbcH [Bacillus subtilis subsp. spizizen str. 168]	134	134	94%	2e-35	32%	Q45583.3
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator CPE0189 [Clostridium perfringens str. 13]	132	132	84%	9e-35	30%	P28833.1
RecName: Full=Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator TM_G226 [Thermoplasma maritima MSB8]	131	131	90%	1e-34	31%	Q99YQ1.1

Figura 9 - BLASTp do gene de locus tag NGO0718, feito a partir do NCBI. (cont.)

Conhecendo a proteína que mais se assemelha à proteína de interesse efectua-se uma pesquisa a partir da *UniProt* para então descobrir a sua possível função. Neste caso considerou-se que tem função de Transcription regulation.

Functionⁱ

Represses the expression of the hex regulon (zwf, eda, gfp and gap). [By similarity](#)

Regions

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view	Feature identifier	Actions
DNA binding ⁱ	37 - 56	20	H-T-H motif PROSITE-ProRule annotation ▼			Add BLAST

GO - Molecular functionⁱ

- carbohydrate binding [Source: InterPro](#)
- sequence-specific DNA binding transcription factor activity [Source: InterPro](#)
- DNA binding [Source: UniProtKB-KW](#)

GO - Biological processⁱ

- carbohydrate metabolic process [Source: InterPro](#)
- transcription, DNA-templated [Source: UniProtKB-KW](#)
- cellular response to DNA damage stimulus [Source: EcoCyc](#) [▼](#)

Complete GO annotation...

Keywords - Molecular functionⁱ

Repressor

Keywords - Biological processⁱ

Transcription, Transcription regulation

Keywords - Ligandⁱ

DNA-binding

Figura 10 - análise das funções da proteína mais semelhante a partir da UniProt.

Contudo, nem sempre se podem fazer associações deste tipo, uma vez que por vezes não há organismos com graus de semelhança suficientemente elevados para que sejam considerados homólogos.

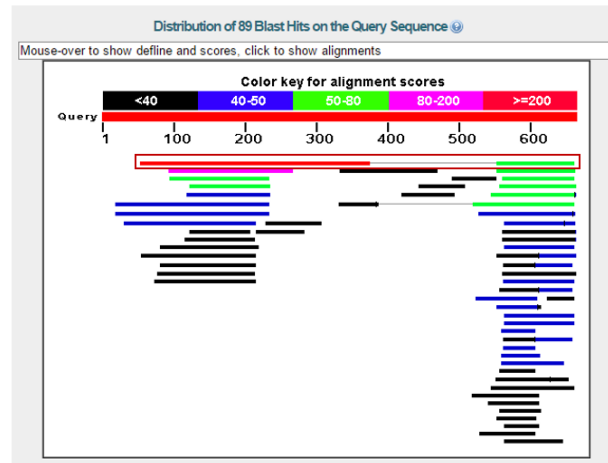


Figura 11 - BLASTp da proteína correspondente ao gene de locus tag NGO0608.

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
ResName: Full-Membrane bound lytic murein transglycosylase D_AltName: Full-Murein hydrolase D_AltName: Full-Regulatory protein Drift_Flags_Precursor [Kaz]	207	283	64%	9e-68	36%	P04628.1
ResName: Full-Putative ribitol/ribose resistance protein (Alicyclohexa sp. M1)	124	124	26%	6e-31	37%	P32820.1
ResName: Full-N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sra1_Flags_Precursor [Staphylococcus epidermidis RP92A]	60.5	110	16%	2e-08	32%	Q04802.1
ResName: Full-N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sra1_Flags_Precursor [Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305]	60.1	103	15%	2e-08	35%	Q48004.1
ResName: Full-SP62 arabinose-derived uncharacterized transglycosylase YnmB Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	60.8	60.8	20%	3e-08	37%	Q01974.2
ResName: Full-Peptidoglycan endopeptidase LyE_AltName: Full-Autolysin LyE_AltName: Full-Cell wall-associated peptidase CWP49F_AltName: Full-Gamma	57.4	158	16%	2e-07	34%	Q07532.2
ResName: Full-N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sra1_Flags_Precursor [Staphylococcus haemolyticus JSCC1435]	52.8	100	17%	5e-06	31%	Q48351.1
ResName: Full-Autolysin_AltName: Full-Beta-glucosidase_AltName: Full-Peptidoglycan hydrolase_Flags_Precursor [Enterococcus faecalis V583]	53.1	356	29%	6e-06	29%	P37710.2
ResName: Full-Putative murein lytic transglycosylase YnfJ Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	50.1	50.1	17%	8e-06	36%	Q01908.1
ResName: Full-Internal virion protein gp16_AltName: Full-Gene product 16_Short-Gp16 [Enterobacteria phage T7]	49.7	49.7	17%	9e-05	37%	P03726.1
ResName: Full-Muramidase-2_AltName: Full-L-lysine-N-acetylmuramoylhydrolase_AltName: Full-L-lysine_AltName: Full-Peptidoglycan hydrolase_AltName: F	48.5	170	20%	1e-04	26%	P38648.1
ResName: Full-Soluble lytic murein transglycosylase_AltName: Full-Peptidoglycan lytic endotransglycosylase_AltName: Full-Slt9_Flags_Precursor [Staphylococcus]	48.5	48.5	32%	2e-04	30%	P38434.2
ResName: Full-Probable azelastatin endopeptidase LyE_AltName: Full-Cell wall-associated peptidase CWP33_AltName: Full-Gamma-D-glutamate-meso-	46.6	92.4	15%	4e-04	24%	P54621.1
ResName: Full-N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sra1_Flags_Precursor [Staphylococcus aureus RF122]	46.6	86.3	15%	4e-04	30%	Q22074.1

Figura 12 - BLASTp da proteína correspondente ao gene de locus tag NGO0608. (cont.)

Na imagem anterior consegue-se verificar que na zona rodeada a vermelho a zona de semelhança com outras proteínas é muito má, não havendo nenhuma com uma zona *query cover* aceitável. Verificando a descrição consegue-se averiguar que embora o primeiro *hit* apresente baixo valor de *query cover*, apresenta um *e-value* muito aceitável.

Em situações destas, é aconselhável usar outro tipo de estratégias para que consigamos obter dados mais exatos, como é o caso da análise filogenética de seqüências.

Scripts desenvolvidos

Foi desenvolvido um *script* em *python* que faz o *blastp* e devolve um ficheiro com os resultados. O utilizador insere o valor do *locus tag* correspondente ao gene que pretende fazer o *blastp*.

Também é feita a análise desse *blast*, nessa análise são apresentados todos os *hits*, os seus *evalues* e as suas posições.

Alinhamento múltiplo e Filogenia

Ferramentas deste tipo são bastante úteis para o estudo mais aprofundado de genes/proteínas de interesse. Foi necessário esta análise quer para reforçar as anotações feitas, quer para conduzir a hipóteses que ainda não tenham sido determinadas por outros métodos.

De maneira a estudar melhor uma proteína selecionou-se a sequência da proteína em estudo e um conjunto de sequências homólogas de organismo selecionados (resultantes do *Blastp*). Primeiramente realizou-se o alinhamento múltiplo e depois determinou-se a árvore filogenética correspondente.

Foi desenvolvido um script para determinar o alinhamento múltiplo de sequências e a árvore filogenética. Para o alinhamento múltiplo é passado como argumento um ficheiro com extensão *.phy* resultante do *Clustal Omega*. Para determinar a árvore, é passado como argumento um ficheiro *.dnd* resultante da ferramenta *ClustalW2*.

Proteína: YP_207698.1

Localização: Membrana plasmática

Pela anotação do uniprot é uma proteína unreviewed e localiza-se na membrana citoplasmática. Como a sua função é desconhecida fez-se a sua análise filogenética.

Numa primeira etapa fez-se um *Blast* de proteínas obtendo-se o seguinte resultado:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Uncharacterized protein HI_1376 [Haemophilus influenzae Rd KW20]	300	300	98%	1e-99	56%	P44170.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=30S ribosomal protein S8 [Desulfurococcus kamchatkensis 1221n]	34.7	34.7	21%	0.31	30%	B8D5V5.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Polycystic kidney disease protein 1-like 1; AltName: Full=PC1-like 1 protein; AltName: Full=Polycystin-1L1 [Homo sapiens]	32.3	32.3	66%	5.6	25%	Q8TD09.1

Figura 13 - Resultados da ferramenta *Blastp* para a proteína YP_207698.1.

Como se pode verificar apenas uma das sequências obtidas como resultado tem valores *Evalue*, *Ident* e *Query cover* satisfatórios. Com estes resultados pode-se ver que há bastantes semelhanças entre a proteína em estudo e o primeiro resultado do *blastp* (P44170.1), que se encontra destacado a vermelho.

Para verificar e testar a similaridade entre as sequências, realizou-se um alinhamento duplo com a sequência em estudo e todas as sequências resultantes do blast. O esperado é que as duas últimas sequências da figura ... sejam distantes das restantes.

Para os alinhamentos duplos utilizou-se o código desenvolvido pelo grupo, em que foi passado como argumento o ficheiro *.phy*

Por fim desenvolveu-se a árvore filogenética, utilizando a ferramenta *Clustalw2* e para gerar a árvore utilizou-se o código desenvolvido pelo grupo. O resultado final foi o seguinte:

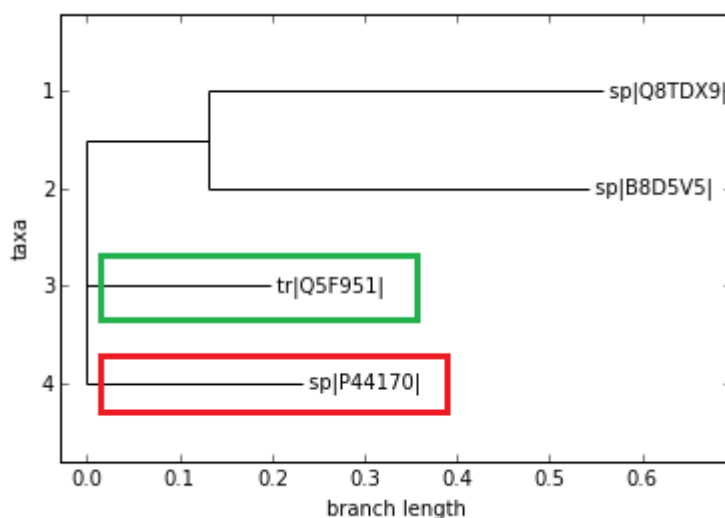


Figura 14 – Árvore Filogenética

Pode-se verificar que a proteína em estudo (verde) e a proteína obtida como primeiro resultado do *blast* (vermelho), são mais próximas do que as restantes, o que era de esperar. No entanto o seu grau de semelhança não é assim tão elevado.

Fazendo uma pesquisa no Uniprot pela proteína *P44170*, pode-se ver que se trata de uma proteína *reviewed*, sendo o seu nome **Uncharacterized protein HI_1376** e está relacionada com a membrana plasmática. A proteína que em estudo tem uma localização celular na membrana plasmática, o que comprova que ambas têm algum grau de similaridade.

Esta análise veio intensificar a hipótese anterior: a proteína em estudo, YP_207698.1 tem uma localização celular na membrana plasmática, sendo uma potencial candidata à ação dos antibióticos.

Proteína: YP_207697.1

Localização: Membrana plasmática

A mesma análise foi feita para a proteína YP_207697.1. Após o *Blastp* obteve-se os seguintes resultados:

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download Gen?opt. Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Neisseria meningitidis MC58]	98.2	98.2	28%	1e-22	69%	P63969.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Neisseria gonorrhoeae FA 1090]	97.8	97.8	28%	1e-22	69%	Q5F5M1.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Clostridium difficile 630]	94.4	94.4	27%	3e-21	69%	Q182E7.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Acinetobacter baumannii AYE]	93.6	93.6	27%	4e-21	69%	B0VA24.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Acinetobacter sp. ADP1]	92.8	92.8	27%	8e-21	67%	Q6F6R1.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Picrophilus torridus DSM 9790]	91.7	91.7	29%	2e-20	63%	Q6L0S6.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Burkholderia lata]	91.7	91.7	27%	2e-20	67%	Q39JC7.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Thermus thermophilus HB27]	90.9	90.9	27%	3e-20	66%	Q72GN6.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Clostridium novyi NT]	91.3	91.3	27%	3e-20	67%	A0Q1R3.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ 1 [Thermus thermophilus HB8]	90.9	90.9	27%	3e-20	66%	Q5SLW9.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Bordetella avium 197N]	90.9	90.9	27%	3e-20	66%	Q2KWA4.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Cupriavidus metallidurans CH34]	89.7	89.7	27%	1e-19	64%	Q1LJ82.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Azoarcus sp. BH72]	89.7	89.7	27%	1e-19	66%	AIK4C4.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Burkholderia multivorans ATCC 17616]	89.7	89.7	27%	1e-19	66%	Q6NSW9.1
RecName: Full=Chaperone protein DnaJ [Acidiphilium cryptum JF-5]	89.4	89.4	27%	1e-19	65%	A5FZ18.1

Figura 15 - Resultados do Blastp

Para a análise da filogenia utilizou-se as primeiras sete sequências homólogas. O primeiro passo foi fazer o alinhamento múltiplo das sequências e depois determinar a árvore filogenética. Para gerar a árvore filogenética utilizou-se a ferramenta *ClustalW2* e o código desenvolvido pelo grupo. Este código recebe como argumento o ficheiro resultante do *ClustalW2* (extensão *.dnd*) e cria a respetiva árvore filogenética. O resultado foi o seguinte:

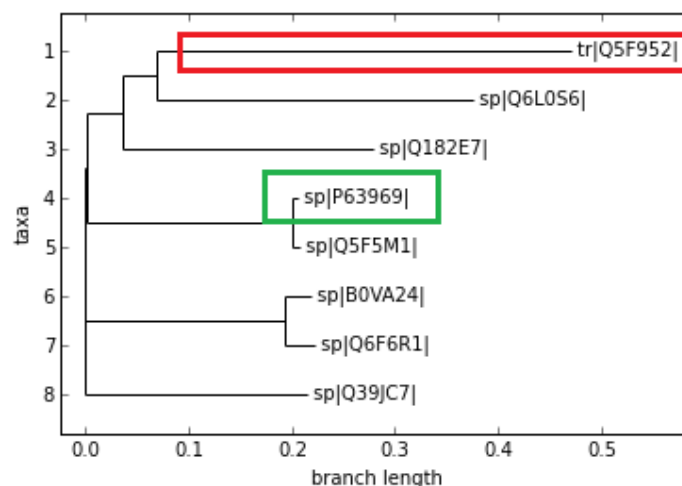


Figura 16 - Árvore filogenética

Pode-se verificar que a sequência em estudo (vermelho) é mais semelhante com a Q6L0S6 e não com a primeira obtida nos resultados do *Blastp* (verde).

Pesquisando na base de dados Uniprot pela *Q6LOS6.1* pode-se ver que é uma proteína reviewed com score 3/5, pertence ao organismo *Picrophilus torridus*, é uma proteína Chaperone e tem função de dna replication e stress response.



Figura 17 - Base de dados Uniprot para a proteína Q6LOS6.1.

Analisando a proteína *P63969.1* na base de dados *Uniprot*, pode-se verificar que pertence ao organismo *Neisseria meningitidis serogroup B*, é reviewed com score 3/5, é uma proteína Chaperone e tem as mesmas funções que a proteína anterior, como é apresentado na figura seguinte:



Figura 18 - Base de dados Uniprot para a proteína P63969.1.

Ambas as proteínas apresentam muita similaridade com a proteína em estudo e ambas têm a mesma função. Com isto podemos concluir que uma possível função para a proteína a ser estudada, YP_207697.1, está relacionada com dna replication e stress response.

Em relação à localização celular utilizou-se a ferramenta *PSort*. Para a proteína a ser estudada após a análise da provável localização obteve-se a membrana plasmática. O mesmo processo foi utilizado para a *P63969.1* e *Q6LOS6.1*. Para estas duas proteínas a localização mais provável obtida foi no citoplasma e não na membrana plasmática, com uma probabilidade de 9.97.

Targets

A transmissão e a infecção gonocócica é um problema global de saúde e estão ainda a ser desenvolvidos medicamentos e vacinas eficazes. Segundo o estudo “Candidate Drug and Vaccine Targets from Various Pathways in *Neisseria gonorrhoeae*”, foram identificados seis *enzyme drug targets* possíveis e três *vaccine targets* a partir de várias vias metabólicas que se prevê que venham a ser essenciais para o agente patogénico.

Num estudo de um artigo, foram identificados 537 genes que compreendem 26 % do número total de sequências de codificação de proteína no genoma da *N. gonorrhoeae* estirpe 1090 FA a serem essenciais e podem ser agrupadas em 21 classes de acordo com classificação funcional COG (Fig._). A identificação de um maior número de genes essenciais neste estudo em relação a um estudo anterior, deve-se ao aumento do número de genes essenciais para a versão atual do DEG (versão 5.2). Os genes essenciais identificados pensa-se serem de vários grupos funcionais. Os genes que estão envolvidos em maquinaria de tradução constituem o maior grupo (91 genes) e o grupo de processamento do RNA representa o menor número (gene 1). A razão entre o número de genes essenciais para os homólogos não humanos dentro um grupo funcional foi considerada alta (91 a 14) na classe de maquinaria de tradução de genes, sendo igual (4 para 4) nos genes no grupo de sinal transdutor (Fig._).

Considerando as vias metabólicas comuns dos hospedeiros patogénicos, estão presentes 76 enzimas metabólicas que apenas são encontradas em *N. gonorrhoeae*. Entre estas enzimas, 67 são citoplasmáticas (potenciais *drug targets*) e 9 pensa-se estarem localizadas na membrana. No entanto, uma destas é uma enzima de superfície (lipoproteína de competência: NGO0277). Das vias metabólicas comuns dos hospedeiros patogénicos, também são identificados 9 integrais de membrana e um transportador gonocócico essencial homólogo não-humano localizado na parede celular. Nove enzimas membranares e dez transportadores membranares pensa-se serem potenciais candidatos a *vaccine targets* de vias metabólicas comuns onde a proteína permease C de transporte de sulfato (*cysW*) pode ser um dos melhores *targets*. Em comparação com a lista de vias metabólicas humanas presentes na base de dados KEGG, são 10 os caminhos que se verificam ser únicos na *N. gonorrhoeae*.

A membrana externa *lipo-oligossacarídeos* da *N. gonorrhoeae* confere a virulência bacteriana. Assim, tendo a via biossintética lipo-polissacárideo como *target* pode ser eficaz para evitar a infecção. As proteases *IgA1*, *Opa*, *lipo-oligossacarídeos*, proteína-I *lactoferrina* (Lbp1, Lbp2), e 2C7 *epitopo oligosacárido* (OS) são referidos como candidatos a vacinas. De entre as 8 proteínas da via biossintética lipo-polissacáridea identificadas, a *UDP-3-O-acyl N-acetylglucosamine deacetylase* (*lpxC/EnvA*) e o *lipopolysaccharide heptosyltransferase-I* (*rfaC*) também se pensam estar envolvidos no metabolismo amino ácido (arginina, prolina, histidina) e nas vias *glycan structures-biosynthesis-2*. Portanto, tendo em conta que *envA* e *rfaC* estão envolvidos em duas vias metabólicas, estes podem ser considerados melhores *targets*.

O sistema bacteriano de duas componentes é crucial para o crescimento e sobrevivência em condições extremas. São quatro as enzimas essenciais e duas as proteínas reguladoras consideradas potenciais *drug targets* nesta via. Entre estas enzimas identificadas, *tryptophan synthase subunit A (trpA)*, *indole-3-glycerol-phosphate synthase (trpC)*, e *anthranilate phosphoribosyltransferase (trpD)* também são considerados componentes principais na fenilalanina, na tirosina, e nas vias de biossíntese do triptofano. Portanto, tendo como *targets* estas três enzimas, podem ser interrompidas as vias essenciais para a sobrevivência e virulência da *N. gonorrhoeae* e, portanto, esta pode ser uma potencial estratégia de tratamento antibacteriano [5].

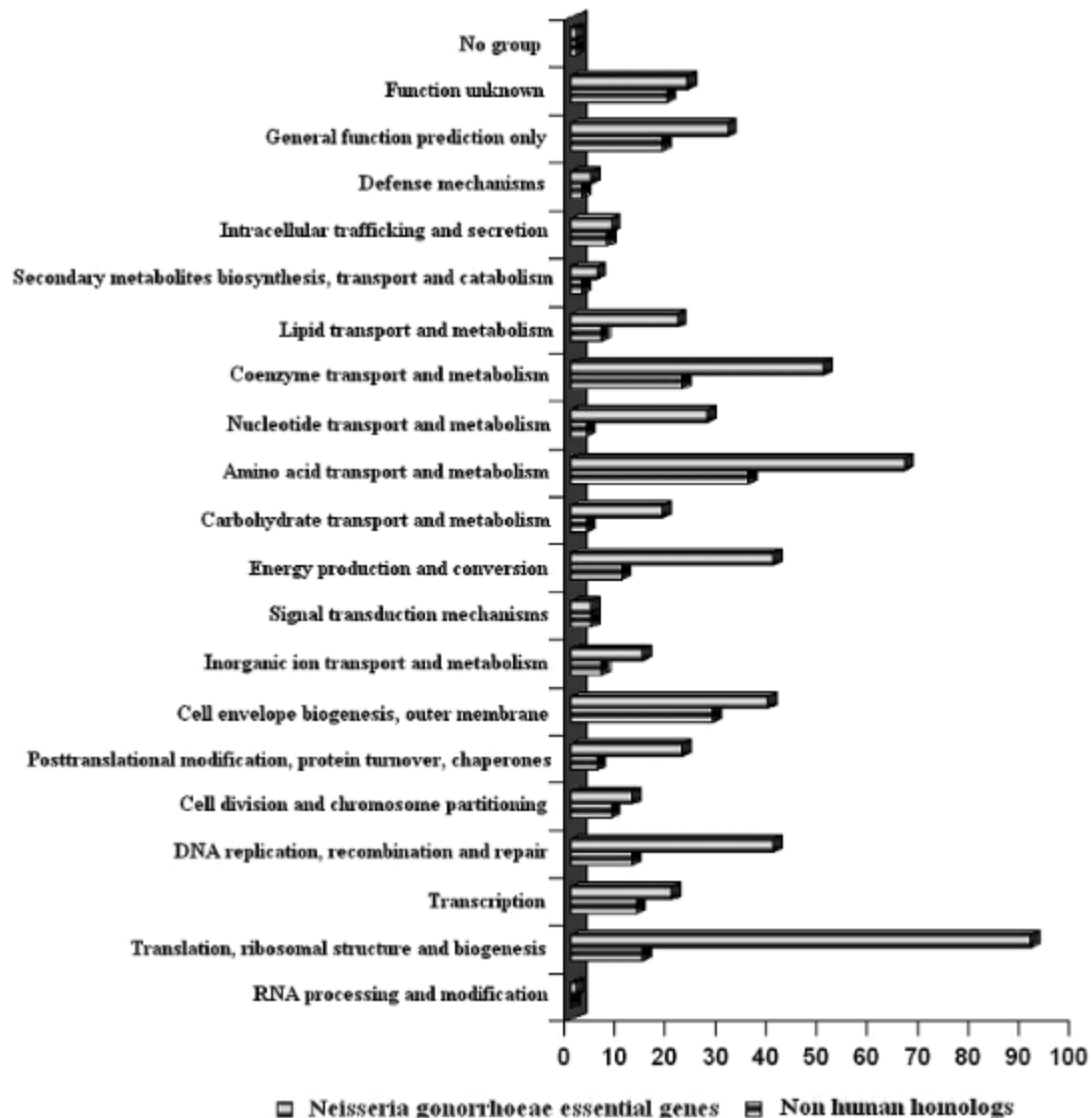


Figura 19 – Genes essenciais e homólogos não-humanos

Código e utilizador

De maneira a haver uma interação com o utilizador, foi desenvolvido um menu em que são disponibilizadas várias opções, tais como: obter ficheiro correspondente à zona do genoma, ver as anotações desse ficheiro, obter a tabela inicial com todos os genes, fazer blast, pesquisar no uniprot, entre outras.

```
+++++++ PROJETO DE LABORATORIOS DE BIOINFORMATICA +++++++
+++++++
1 - Get genome file
2 - Global Annotations genome
3 - Get genes table
4 - Blast
5 - Blast analysis
6 - Get Uniprot ID
7 - Get Uniprot info
8 - Get Uniprot xml
9 - Multiple Alignments
10 - Phylogeny
0 - Exit
+++++++

Insira a opcao desejada:
```

Figura 20 - Menu principal.

Outro menu foi criado, neste menu é possível fazer alguma pesquisa de artigos. O utilizador pode pesquisar artigos pelo título, autor e se assim o preferir fazer a pesquisa de todos os artigos sobre o organismo em estudo. A pesquisa foi feita no *Pubmed*.

```
+++++++ PESQUISA DE ARTIGOS +++++++
+++++++
1 - Todos artigos da Neisseria gonorrhoeae
2 - Procurar artigo por título
3 - Procurar artigo por autor
4 - Procurar abstract
5 - Todos artigos sobre resistência
0 - Exit
+++++++

Insira a opcao desejada:
```

Figura 21 - Menu de pesquisa de artigos.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho conseguimos fazer um estudo mais detalhado da zona do genoma que nos foi destinada. Assim, a nível de literatura conseguimos comprovar que a melhor forma de inativar a patogenicidade desta bactéria será tendo como alvo a sua membrana citoplasmática. Sabendo isso todo o trabalho se direccionou na pesquisa, através de bases de dados e ferramentas bioinformáticas, para se fazer localizar todos os genes de interesse, ou seja, que estejam relacionados com funções da membrana citoplasmática. Essas bases de dados (como o caso do NCBI, UniProt, KEGG, BRENDA, etc.) fornecem a mais variada informação relativo a genes e proteínas estudadas até ao momento. Já as ferramentas bioinformáticas que nos permitem trabalhar com a informação fornecida por essas bases de dados. Ferramentas essas (como o caso de *BLAST*, árvores filogenéticas, *Psort*, etc.) permitem fazer procuras mais detalhadas de determinados genes ou então fazer comparações entre sequências genómicas ou protéicas de interesse e descobrir outras sequências semelhantes já estudadas, entre outras funções.

Para este relatório foram utilizadas ferramentas que consistem em *scripts* realizados pelo grupo para recolha de informação que foram, posteriormente, completados a partir de outras ferramentas fornecidas *online*.

Para tal, focou-se na realização de uma tabela com a listagem de genes e das suas principais anotações recolhidas a partir das referidas ferramentas, dando especial atenção às anotações referentes às suas funções e a sua localização celular para então se localizar todos os genes de interesse.

Este tipo de análise verificou-se fundamental para quando se pretende conhecer o funcionamento de um organismo e as melhores formas de o melhorar ou então de combater a sua patogenicidade, dependendo do objetivo pretendido. Contudo, o melhoramento da informação fornecida só será possível se houver uma actualização constante da informação fornecida online.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Kanti Pabbaraju, Sallene Wong, Joanna J. Song, Ameeta E. Singh, Ron Read, and Steven J. Drewsa, Utility of Specimens Positive for *Neisseria gonorrhoeae* by the Aptima Combo 2 Assay for Assessment of Strain Diversity and Antibiotic Resistance, *J Clin Microbiol.* 2013 Dec; 51(12): 4156–4160.
- [2] Młynarczyk-Bonikowska B, Kujawa M, Młynarczyk G, Malejczyk M, Majewski S, [Resistance to ciprofloxacin of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland in 2012-2013], *Med Dosw Mikrobiol.* 2014;66(2):99-104.
- [3] Kovari H, de Melo Oliveira MD, Hauser P, Läuchli S, Meyer J, Weber R, Zbinden R, Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Switzerland to Cefixime and Ceftriaxone: antimicrobial susceptibility data from 1990 and 2000 to 2012, *BMC Infect Dis.* 2013 Dec 26;13:603. doi: 10.1186/1471-2334-13-603.
- [4] Lewis DA, Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: when theory becomes reality, *Curr Opin Infect Dis.* 2014 Feb;27(1):62-7. doi: 10.1097/QCO.0000000000000025.
- [5] D. Barh and A. Kumar, Candidate Drug and Vaccine Targets from Various Pathways in *Neisseria gonorrhoeae*, *In Silico Biology* 9 (2009) 225–231, DOI 10.3233/ISB-2009-0399, IOS Press.
- [6] D. Barh and A. Kumar, Candidate Drug and Vaccine Targets from Various Pathways in *Neisseria gonorrhoeae*, *In Silico Biology* 9 (2009) 225–231, DOI 10.3233/ISB-2009-0399, IOS Press.

WEBGRAFIA

- [7] <http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/gonorrhoeae.htm>
- [8] http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n4/fig_tab/nrmicro2097_F1.html
- [9] <http://www.aafp.org/afp/2006/0515/p1779.html>