

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização de proteínas dominantes de função desconhecida na  
superfície de *Mesomycoplasma hyopneumoniae***

Tese de Doutorado

Priscila Souza dos Santos

Porto Alegre, dezembro de 2023

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização de proteínas dominantes de função desconhecida na  
superfície de *Mesomycoplasma hyopneumoniae***

Priscila Souza dos Santos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Coorientadora: Dra. Jéssica Andrade Paes

Porto Alegre, dezembro de 2023

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta tese ao meu filho  
amado Oliver.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por renovar a minha fé diariamente. Por ter me fortalecido nos momentos mais desafiadores da pós-graduação e por ter me permitido desfrutar de conquistas ao longo do doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Ferreira, pela oportunidade em trabalhar em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos preciosos e dedicação. O meu muito obrigada pela orientação, competência e auxílio durante o meu doutorado.

À minha coorientadora, Dra. Jéssica Paes, pelos ensinamentos valiosos e por toda contribuição ao longo dessa trajetória. Obrigada por me inspirar a ser uma cientista e pesquisadora melhor. Obrigada pela amizade.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Zaha, pelo auxílio, ensinamentos e contribuições aos meus trabalhos.

Aos colegas “Micoplasmas”, Jéssica, Bryan, Lais e Felipe, pelas trocas de conhecimento e amizade.

Aos colegas que me auxiliaram no desenvolvimento dos meus estudos experimentais: Jéssica, Lais, Gabriela, Felipe, Veridiana e profs. Karina, Arnaldo e Henrique.

Aos colegas dos laboratórios 204/206/210 do Centro de Biotecnologia, por compartilharem ciência e bons momentos, seja no laboratório, no RU, nos cafés ou nas confraternizações.

Ao meu filho, Oliver, que já vem me transformando para melhor. Descobri a gravidez durante a escrita desta tese e como é gratificante vê-lo fazer parte desta minha grande conquista profissional. Muito obrigada, meu filho!

Ao meu parceiro de vida, Cristhian, por sempre me apoiar, me incentivar e ser o meu porto seguro. Obrigada pela compreensão e por sempre me escutar frente à montanha-russa da pós-graduação. Esta conquista é de toda a nossa família!

Aos meus pais, Rose e Roberto, pelo amor incondicional e por sempre me apoiarem em todas as decisões. Estar a quilômetros de distância de vocês não é fácil, mas vocês me ensinaram a correr atrás dos meus objetivos. Obrigada por tudo!

Aos meus sogros, Iria e Nilton, que também me apoiaram e incentivaram. As visitas de vocês aqui em Porto Alegre me faziam matar um pouco da saudade da Bahia e renovavam as minhas forças.

Aos colegas, professores e funcionários do PPGBCM que cruzaram o meu caminho científico e colaboraram de alguma forma para o andamento do meu projeto de doutorado.

Por fim, gostaria de agradecer as empresas de fomento CAPES e CNPq por financiarem a minha bolsa e as pesquisas aqui desenvolvidas.

## SÚMARIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. A classe <i>Mollicutes</i> .....	14
1.1.1. <i>Mesomycoplasma hyopneumoniae</i> e <i>Mesomycoplasma flocculare</i> .....	15
1.2. Pneumonia enzoótica suína .....	15
1.2.1. Formas de controle de infecções de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	16
1.2.2. Diagnóstico de infecções por <i>M. hyopneumoniae</i> .....	18
1.2.3. Determinantes de patogenicidade de <i>M. hyopneumoniae</i> e respostas do hospedeiro suíno no desenvolvimento da PES .....	20
1.3. Estudos comparativos de <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. flocculare</i> .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVAS</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
3.1. Objetivo geral .....	29
3.2. Objetivos específicos .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
4.1. Identificação de domínios diferenciais e processamento endoproteolítico em PUFs dominantes na superfície de <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. flocculare</i> ...	31
4.2. Caracterização imunológica de dois segmentos de proteoformas dominantes na superfície de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 .....	44
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	63
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	69
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70
<b>ANEXO</b> .....	81
<i>Curriculum vitae</i> resumido .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	grau Celsius
>	maior que
≥	maior ou igual
<	menor que
≤	menor ou igual
%	porcentagem
<b>CDS</b>	sequência de DNA codificadora, do inglês <i>coding DNA sequence</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>ELISA</b>	do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>GC</b>	guanina + citosina
<b>GST</b>	glutathiona S-transferase, do inglês <i>glutathione S-transferase</i>
<b>IL</b>	interleucina
<b>Kb</b>	quilobase, do inglês kilobase
<b>LC-MS/MS</b>	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, do inglês <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
<b>NCBI</b>	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NSAF</b>	do inglês <i>normalized spectral abundance factor</i>
<b>PBS</b>	solução salina tamponada com fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	reação da cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PEP</b>	pneumonia enzoótica suína, do inglês <i>porcine enzootic pneumonia</i>
<b>PES</b>	pneumonia enzoótica suína
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PRDC</b>	complexo de doenças respiratórias suínas, do inglês <i>porcine respiratory disease complex</i>
<b>qPCR</b>	reação da cadeia da polimerase quantitativa, do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>TBST</b>	solução salina tamponada com tris e tween-20, do inglês <i>tris-buffered saline with tween-20</i>



<b>Th</b>	do inglês <i>T helper</i>
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
<b>VNTR</b>	repetição em tandem de número variável, do inglês <i>variable number tandem repeat</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processamento pós-traducional em adesinas na superfície de *M. hyopneumoniae*.....22

### Seção 4.1.

Fig. 1. MHP1 structural features, endoproteolytic processing, derived proteoforms and differential processing between strains/species and subcellular fractions.....36

Fig. 2. MF1 structural features, endoproteolytic processing, derived proteoforms and differential processing between strains/species.....37

Fig. 3. ECs of the full-length amino acid sequences of PUFs from OGs1-5. ECs were measured for *M. hyopneumoniae* 7448 (MHP), *M. hyopneumoniae* J (MHJ) and *M. flocculare* (MF) PUFs in all OGs.....39

### Seção 4.2.

Fig. 1. Representation of the full-length amino acid sequence of MHP7448\_0489 and linear B-cell epitope predictions.....52

Fig 2. ODs values of the rMhP1<sub>126-319</sub> and rMhP2<sub>443-614</sub> immunoreactivities against pig serum samples by indirect ELISA.....54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes diagnósticos comerciais baseados em ELISA para a detecção sorológica de infecções por <i>M. hyopneumoniae</i> .....	19
--	----

### Seção 4.1.

Table 1. Orthogroups corresponding to the top 5 most represented surface PUFs in <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 and their orthologs from <i>M. hyopneumoniae</i> J and <i>M. flocculare</i> .....	34
---	----

### Seção 4.2.

Table 1. ROC analysis for rMhP1 <sub>126-319</sub> and rMhP2 <sub>443-614</sub> considering their immunoreactivities against serum samples from PD and ND groups.....	53
---	----

Table 2. Comparison between ELISA-rMhP2 <sub>443-614</sub> and ELISA-T.....	54
---	----

## RESUMO

*Mesomycoplasma (Mycoplasma) hyopneumoniae* é a bactéria causadora da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença crônica que gera grandes perdas econômicas para a indústria suína. De forma geral, sabe-se que determinantes de patogenicidade da bactéria e fatores do hospedeiro contribuem para o estabelecimento da PES. Ainda assim, esse cenário é complexo e os mecanismos associados ao desenvolvimento da PES precisam ser melhor elucidados. Uma parte considerável das sequências de DNA codificadoras (CDSs) no genoma de *M. hyopneumoniae* estão anotadas como proteínas de função desconhecida (PUFs). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar *in silico* e imunologicamente PUFs e seus segmentos dominantes na superfície da linhagem patogênica de *M. hyopneumoniae* 7448. Através de comparações de sequências de aminoácidos das cinco PUFs mais abundantes na superfície de *M. hyopneumoniae* 7448 e suas ortólogas da linhagem não patogênica *M. hyopneumoniae* J e da espécie comensal geneticamente relacionada *Mesomycoplasma (Mycoplasma) flocculare*, foi possível identificar várias diferenças em domínios, regiões de desordem e motivos repetidos. Além disso, também foram identificados processamentos endoproteolíticos (gerando diferentes proteoformas) e cobertura de epítomos diferenciais entre as PUFs ortólogas. Tais diferenças têm possíveis implicações funcionais para estas proteínas, possivelmente relevantes para interações patógeno-hospedeiro. Dois segmentos de proteoformas identificados para a PUF de superfície mais abundante de *M. hyopneumoniae* 7448 expressos heterologicamente em *Escherichia coli*, mostraram antigenidades diferenciais frente a soros de suínos com ou sem PES. Além disso, um desses segmentos recombinantes apresentou potencial para imunodeteção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*. Com isso, os estudos conduzidos nesse trabalho contribuíram para a caracterização de PUFs ainda não avaliadas quanto ao seu papel na patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, podendo ser utilizados como possíveis candidatos em futuros estudos para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico e vacinas contra PES.

## ABSTRACT

*Mesomycoplasma (Mycoplasma) hyopneumoniae* is a bacterium that causes porcine enzootic pneumonia (PEP), a chronic disease related to important economic losses to the pig industry. In general, it is known that determinants of bacterial pathogenicity and host factors contribute to the establishment of PES. However, this scenario is complex and mechanisms related to the PEP development need to be better understood. A considerable part of the coding DNA sequences (CDSs) in the genome of *M. hyopneumoniae* is annotated as proteins of unknown function (PUFs). Thus, the aim of this study was to characterize *in silico* and immunologically the PUFs and their segments dominant on the surface of the pathogenic *M. hyopneumoniae* strain 7448. Comparing the amino acid sequences of the five PUFs more abundant on the surface of *M. hyopneumoniae* 7448 with orthologs from the non-pathogenic *M. hyopneumoniae* strain J and from the genetically related commensal species *Mesomycoplasma (Mycoplasma) flocculare*, it was identified several differences in domains, disordered regions e repeated motifs. Moreover, it was also identified differential endoproteolytic processing (forming different proteoforms) and epitope covered among the ortholog PUFs. Such differences have possible functional implications for these proteins, possibly relevant to host-pathogen interactions. Two proteoform stretches identified for the most abundant surface PUF of *M. hyopneumoniae* 7448, heterologously expressed in *Escherichia coli*, showed differential antigenicities against sera from pigs with or without PEP. Moreover, one of these recombinant stretches presented a potential for antibody immunodetection against *M. hyopneumoniae*. Taken together, our studies contributed to the characterization of PUFs that have not yet been evaluated in the context of *M. hyopneumoniae* pathogenicity, and can be used as possible candidates in future studies for the development of immunodiagnostic tests and vaccines against PEP.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A classe *Mollicutes*

A classe *Mollicutes* é formada por bactérias caracterizadas pela ausência de parede celular (RYCROFT, 2020). De acordo com a taxonomia de *Mollicutes* depositada no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), essa classe inclui bactérias de diferentes ordens (*Mycoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Haloplasmatales*, etc), famílias (*Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Haloplasmataceae*, etc) e gêneros (*Mesomycoplasma*, *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Haloplasma*, etc). Baseado em abordagem molecular e filogenética, algumas espécies anteriormente classificadas como do gênero *Mycoplasma* passaram a ser classificadas como pertencentes ao gênero *Mesomycoplasma* (GUPTA *et al.*, 2018). Por exemplo, espécies como *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare* passaram a ser designadas como *Mesomycoplasma hyopneumoniae* e *Mesomycoplasma flocculare*, respectivamente. Além disso, essas espécies, bem como outras espécies do gênero *Mesomycoplasma*, passaram a ser classificadas como da família *Metamycoplasmataceae* e da ordem *Mycoplasmoidales*.

Os organismos pertencentes à classe *Mollicutes* também são abordados como “micoplasmas” na literatura (CITTI *et al.*, 2018; CITTI; BLANCHARD, 2013; RAZIN; HAYFLICK, 2010). Micoplasmas podem colonizar uma diversidade de hospedeiros como, por exemplo, mamíferos, plantas e répteis (RAZIN; HAYFLICK, 2010). De forma geral, são bactérias pequenas e exibem morfologia pleomórfica (RYCROFT, 2020). Além disso, são autorreplicáveis e possuem genomas reduzidos, com baixo conteúdo de guanina e citosina (GC) (CITTI; BLANCHARD, 2013). Acredita-se que micoplasmas evoluíram de organismos gram-positivos, com progressiva redução do genoma (CITTI *et al.*, 2018). Devido ao genoma reduzido, micoplasmas são deficientes em algumas rotas metabólicas e, assim, dependem de nutrientes do hospedeiro ou, em caso de cultivo, de meio de cultura rico para obtenção de algumas moléculas essenciais para sua sobrevivência (RAZIN, 2006).

Micoplasmas podem apresentar interações complexas com os seus hospedeiros suscetíveis, envolvendo processos como adesão, evasão de imunidade e imunomodulação (YIWEN *et al.*, 2021). Essas bactérias podem residir

extracelularmente e/ou intracelularmente em células do hospedeiro e podem (ou não) causar doença (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Como exemplo, no gênero *Mesomycoplasma*, há espécies que causam danos aos seus hospedeiros e são patogênicas, como é o caso de *M. hyopneumoniae*, que causa a pneumonia enzoótica suína (PES) (MAES *et al.*, 2018). Por outro lado, existem espécies que podem ser apenas comensais, como é o caso de *M. flocculare* (FRIIS, 1974).

#### 1.1.1. *Mesomycoplasma hyopneumoniae* e *Mesomycoplasma flocculare*

*M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* colonizam o trato respiratório de suínos (RYCROFT, 2020). *M. hyopneumoniae*, além de ser o agente etiológico causador da PES, também está associado ao complexo de doenças respiratórias em suínos (abreviado em inglês como PRDC) (MAES *et al.*, 2018). Já *M. flocculare* não causa danos aparentes ao hospedeiro suíno (YOUNG *et al.*, 2000). De forma geral, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* são de difícil crescimento, sendo o meio Friis utilizado para o cultivo dessas bactérias (FRIIS, 1975).

*M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* são espécies filogeneticamente próximas (SIQUEIRA *et al.*, 2013; STEMKE *et al.*, 1992). Atualmente (novembro de 2023), foram depositadas no NCBI sequências de 26 genomas de linhagens de *M. hyopneumoniae*, sendo que para 12 dessas linhagens, os níveis de montagem dos genomas estão completos. Dentre essas diferentes linhagens conhecidas, encontram-se as linhagens 7448 e J. Enquanto *M. hyopneumoniae* 7448 causa a PES (ver a seção 1.2.), *M. hyopneumoniae* J não causa doença (ZIELINSKI & ROSS, 1993). Em relação as linhagens conhecidas de *M. flocculare*, foram depositadas sequências de 8 genomas no NCBI (novembro de 2023), sendo que apenas para a linhagem Ms42, o nível de montagem do genoma está completo.

#### 1.2. Pneumonia enzoótica suína

A pneumonia enzoótica suína (PES) é uma doença respiratória crônica de ocorrência mundial causada por *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2020a). No Brasil, já foi apontado que em torno de 38-95% de amostras de suínos de regiões do centro-oeste, sudeste e sul foram positivos para *M. hyopneumoniae* (BALESTRIN *et al.*, 2022; PACCE *et al.*, 2019). A alta prevalência e os

consequentes custos de controle da doença (ver a seção 1.2.1.) geram grandes perdas econômicas para a indústria suína (MAES *et al.*, 2008).

Existem diferentes formas possíveis para a transmissão de *M. hyopneumoniae*, como por exemplo, através das vias vertical e horizontal (GARZA-MORENO *et al.*, 2018; SIBILA *et al.*, 2009). A via vertical se caracteriza pela transmissão das porcas para os seus leitões, enquanto que a via horizontal se caracteriza pela transmissão entre suínos infectados e suscetíveis à infecção. De acordo com Sibila *et al.* (2009), a transmissão de *M. hyopneumoniae* ocorre pelo contato direto dos animais ou através da liberação da bactéria em secreções respiratórias dos animais infectados.

*M. hyopneumoniae* pode infectar suínos em todas as fases de desenvolvimento dos animais, mas é especialmente nas fases de crescimento e terminação que os sinais clínicos são mais evidentes (MAES *et al.*, 2018; PIETERS *et al.*, 2020). Os principais sinais clínicos relacionados à PES são tosse seca e febre (CARR; SIBILA; SEGALÉS, 2020). Além disso, suínos infectados por *M. hyopneumoniae* apresentam retardo do crescimento, o que leva ao aumento do índice de conversão alimentar. Quando à necropsia, as lesões pulmonares observadas em nível macroscópico ocorrem especialmente nos lobos apical, cardíaco e intermediário e as lesões em nível microscópico são caracterizadas por acúmulo de neutrófilos e linfócitos (PIETERS; MAES, 2019).

De forma geral, as infecções por *M. hyopneumoniae* estão associadas a uma alta morbidade e uma baixa mortalidade (PIETERS; MAES, 2019). Entretanto, suínos acometidos por *M. hyopneumoniae* são mais vulneráveis a infecções secundárias por outras bactérias, como *Pasteurella multocida*, e/ou vírus, como o da influenza (LU *et al.*, 2020). Em um cenário de coinfeção com *M. hyopneumoniae* e outras bactérias e/ou vírus, pode ocorrer um aumento da mortalidade dos animais infectados (CARR; SIBILA; SEGALÉS, 2020).

### 1.2.1. Formas de controle de infecções de *M. hyopneumoniae*

Diferentes práticas podem ser empregadas para controlar infecções de *M. hyopneumoniae* em rebanhos suínos, tais como estratégias de manejo. Essas estratégias incluem otimizações e melhorias no sistema de produção, tamanho do



rebanho, biossegurança, dentre outros (MAES *et al.*, 2008). Embora úteis e eficientes, as estratégias de manejo podem não ser suficientes para prevenir ou controlar infecções por *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2020a). Com isso, outras formas de controle são necessárias, como o uso de vacinas.

A vacinação é uma estratégia amplamente utilizada no controle de infecções de *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2018). Formulações vacinais baseadas em extratos brutos de bactérias (bacterinas) são disponíveis comercialmente para *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2021). As vacinas podem diminuir as lesões relacionadas à PES e melhorar o desempenho dos suínos. Entretanto, de forma geral, elas conferem apenas proteção parcial e não evitam a transmissão de *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2020a; MAES *et al.*, 2021). Com o objetivo de desenvolver vacinas mais eficazes, muitos estudos vêm testando diferentes tipos de antígenos e formulações vacinais (BARATE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; OKAMBA *et al.*, 2010; STORINO *et al.*, 2023; VIRGINIO *et al.*, 2014, 2017; WANG *et al.*, 2019; WOOLLEY *et al.*, 2014). De forma geral, as vacinas experimentais avaliadas para *M. hyopneumoniae* foram testadas em camundongos e/ou suínos, tiveram diferentes vias de administração e foram combinadas (ou não) com vacinas para outros patógenos de suínos (MAES *et al.*, 2020a; MAES *et al.*, 2021; SIMIONATTO *et al.*, 2013; TAO *et al.*, 2019). Embora muitas vacinas experimentais tenham gerado resultados promissores, ainda se faz necessário o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2020a; MAES *et al.*, 2021).

Uma vez que apenas o manejo e a vacinação não são capazes de evitar completamente a transmissão e a infecção por *M. hyopneumoniae*, o uso de antimicrobianos pode ser empregado para minimizar o quadro clínico e as lesões associadas à PES (GAUTIER-BOUCHARDON, 2020). Os principais antimicrobianos usados para o tratamento de infecções por *M. hyopneumoniae* são tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, anfenicóis, fluoroquinolonas, dentre outros (MAES *et al.*, 2020b). Contudo, o uso indiscriminado de antimicrobianos para tratar infecções causadas por *M. hyopneumoniae* pode causar resistência e, por isso, a administração do fármaco deve ser feita com cautela (PIETERS; MAES, 2019). Já

foram descritos casos de resistência de *M. hyopneumoniae* a macrolídeos e lincosamidas (STAKENBORG *et al.*, 2005) e fluoroquinolonas (VICCA *et al.*, 2007).

### 1.2.2. Diagnóstico de infecções por *M. hyopneumoniae*

Diferentes métodos de diagnóstico são descritos para a detecção de infecções por *M. hyopneumoniae* em suínos, incluindo o cultivo bacteriano e a detecção de antígenos, ácidos nucleicos e anticorpos contra essa bactéria (GARCIA-MORANTE *et al.*, 2022). O cultivo de *M. hyopneumoniae* ainda é considerado como padrão-ouro de diagnóstico de *M. hyopneumoniae* (CHAE *et al.*, 2020; THACKER, 2004). Entretanto, essa metodologia apresenta desvantagens como multiplicação lenta da bactéria e a também multiplicação de *M. flocculare* e *Mesomycoplasma hyorhinitis* (CHAE *et al.*, 2020; SIBILA *et al.*, 2009). Com o passar do tempo, o diagnóstico molecular passou a ser amplamente utilizado para a detecção de *M. hyopneumoniae*. Foi visto que a amplificação de repetições em tandem em número variado (abreviado em inglês como VNTRs) de nucleotídeos é relevante para a distinção de infecções por diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae* (CASTRO *et al.*, 2006). Além disso, a reação em cadeia da polimerase (abreviado em inglês como PCR) convencional e suas variações, como *nested* PCR e qPCR (PCR quantitativo), são métodos moleculares comumente utilizados no diagnóstico de *M. hyopneumoniae*. De forma geral, as técnicas de *nested* PCR e qPCR apresentam uma sensibilidade maior (a depender da amostra biológica utilizada) (GARCIA-MORANTE *et al.*, 2022).

De forma geral, ainda que testes moleculares sejam interessantes para o diagnóstico da PES, o método de diagnóstico a ser escolhido também depende do estágio de infecção de *M. hyopneumoniae*. Em casos em que já exista a conversão sorológica, os métodos para a detecção de imunoglobulinas contra *M. hyopneumoniae* são utilizados (SIBILA *et al.*, 2009). Para este fim, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs) são comumente empregados para monitorar os rebanhos (CHAE *et al.*, 2020). O ELISA indireto utilizando extrato em Tween-20 de proteínas de *M. hyopneumoniae* como antígenos (ELISA-T) é uma forma utilizada para a detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* (ERLANDSON *et al.*, 2005; MATTHIJS *et al.*, 2019; MOITINHO-SILVA *et al.*, 2012; NETO *et al.*,

2014; NICOLET; PAROZ; BRUGGMANN, 1980). Entretanto, existem outros diferentes testes baseados em ELISA disponíveis comercialmente para a detecção de *M. hyopneumoniae*, incluindo ELISAs indireto, de competição e de bloqueio. A Tabela 1 mostra alguns destes testes comerciais.

**Tabela 1. Testes diagnósticos comerciais baseados em ELISA para a detecção sorológica de infecções por *M. hyopneumoniae*.**

Nome do teste	Nome da empresa	Tipo	Site
“IDEXX M. hyop Ac”	IDEXX	ELISA indireto	<a href="https://www.idexx.com.br/pt-br/livestock/livestock-tests/swine-tests/idexx-m-hyo-ab-test/">https://www.idexx.com.br/pt-br/livestock/livestock-tests/swine-tests/idexx-m-hyo-ab-test/</a>
“Mhyo ELISA SK108”	BioChek	ELISA indireto	<a href="https://biochek.com/swine-elisa/mycoplasma-hyopneumoniae-antibody-test-kit/">https://biochek.com/swine-elisa/mycoplasma-hyopneumoniae-antibody-test-kit/</a>
“ID Screen® <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Competition”	Innovative Diagnostics	ELISA de competição	<a href="https://www.innovative-diagnostics.com/produit/id-screen-mycoplasma-hyopneumoniae-competition/">https://www.innovative-diagnostics.com/produit/id-screen-mycoplasma-hyopneumoniae-competition/</a>
“ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Detection Kit”	Thermo Scientific™	ELISA de bloqueio	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K004311-9">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K004311-9</a>

Os testes sorológicos apresentam vantagens como praticidade e custo não tão elevado. Porém, eles não têm a capacidade de distinguir a origem dos anticorpos, ou seja, se são de origem materna, de infecção natural ou devido à vacinação contra *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2018). Em estudos que utilizaram alguns ELISAs comerciais como métodos de detecção de *M. hyopneumoniae*, as sensibilidades não foram altas (ERLANDSON *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2020). Fatores como a resposta intrínseca do animal bem como o

estágio de conversão sorológica também podem influenciar no resultado dos testes imunológicos (MAES, 2022). De fato, já foi demonstrado que as sensibilidades de testes de ELISA comerciais variaram conforme as fases de infecção por *M. hyopneumoniae* (FANO *et al.*, 2012).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de identificar antígenos de *M. hyopneumoniae* que gerem métodos sorológicos mais sensíveis. Nesse sentido, diferentes antígenos de *M. hyopneumoniae* foram testados, como as P95 e P102 (SIMIONATTO *et al.*, 2022), P97R1 (do inglês, R1 repeat region of P97) (FENG *et al.*, 2014), e a proteína SPase I (do inglês, signal-peptidase I) (MOITINHO-SILVA *et al.*, 2012). De forma geral, as sensibilidades dos ELISAs usando esses antígenos na detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* foram inferiores a 89%, considerando amostras positivas ou negativas para PEP ou em comparação com kits comerciais. Um outro antígeno de *M. hyopneumoniae*, a Mhp366, foi promissor para a detecção de *M. hyopneumoniae* e a discriminação da resposta humoral entre soros de animais imunizados com uma vacina comercial e soros de animais convalescentes (DING; ZHOU; WANG, 2019).

### 1.2.3. Determinantes de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* e respostas do hospedeiro suíno no desenvolvimento da PES

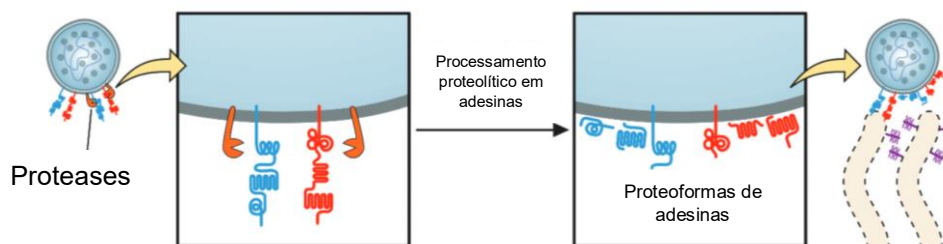
Para o estabelecimento da PES, devem ser considerados tanto os determinantes de patogenicidade (fatores de virulência) de *M. hyopneumoniae* como as respostas do hospedeiro suíno frente à infecção (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). De forma geral, muitas proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* atuam na interação patógeno-hospedeiro e contribuem para o desenvolvimento da PES (KUHNER; JORES, 2020).

A adesão de *M. hyopneumoniae* ao epitélio do trato respiratório de suínos (traqueia, brônquios e bronquíolos) é primordial para o estabelecimento da PES (KUHNER; JORES, 2020). Esse processo leva a danos no trato respiratório dos hospedeiros suínos, como ciliostase e perda de cílios (DEBEY; ROSS, 1994). Muitas adesinas já foram descritas como fatores de virulência para *M. hyopneumoniae*, desempenhando papéis importantes na interação patógeno-hospedeiro e, conseqüentemente, contribuindo para o desenvolvimento da PES.

Por exemplo, regiões da adesina P97, além de atuarem na adesão de *M. hyopneumoniae* aos cílios do trato respiratório de suínos, também se ligam a moléculas do hospedeiro, como fibronectina e heparina (DEUTSCHER *et al.*, 2010; MINION; ADAMS; HSU, 2000). De forma geral, a ligação de adesinas de *M. hyopneumoniae* a moléculas do hospedeiro (fibronectina, heparina e plasminogênio) contribui para a colonização dessa bactéria no epitélio respiratório dos suínos (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). Foi demonstrado que outras adesinas ou proteínas relacionadas à adesão também interagem com moléculas do hospedeiro suíno, como a P46 (TACCHI *et al.*, 2016), a P102 (SEYMOUR *et al.*, 2012), a HSP70 (do inglês, chaperone protein DnaK) e proteínas não caracterizadas (TACCHI *et al.*, 2016).

Processamento pós-traducional também já foi descrito para muitas adesinas ou proteínas “moonlight” (proteínas que apresentam mais de uma função) com também função de adesão na superfície de *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2020; PINTO *et al.*, 2007; TACCHI *et al.*, 2016). Proteoformas derivadas do processamento pós-traducional em proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* podem alterar a superfície dessas bactérias, levando a diferentes interações com o hospedeiro, como imunomodulação e evasão do sistema imune (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). A Figura 1 mostra uma representação esquemática do processamento proteolítico em adesinas de superfície de *M. hyopneumoniae* por meio da ação de proteases. Estudos evidenciaram que proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* processadas proteoliticamente também podem interagir com fibronectina, plasminogênio e heparina (BOGEMA *et al.*, 2012; BURNETT *et al.*, 2006; DEUTSCHER *et al.*, 2012; RAYMOND *et al.*, 2013, 2014; SEYMOUR *et al.*, 2010; TACCHI *et al.*, 2016; WILTON *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2018).

**Figura 1. Processamento pós-traducional em adesinas na superfície de *M. hyopneumoniae***



Fonte: Adaptado de LEAL ZIMMER *et al.* (2020)

A citotoxicidade causada por algumas proteínas de *M. hyopneumoniae* também contribui para patogenicidade da bactéria (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). Por exemplo, proteínas como a SPase I e Mhp597 (fator de virulência putativo) de *M. hyopneumoniae* foram relacionadas a citotoxicidade e apoptose em células epiteliais de suínos (LI *et al.*, 2019; PAES *et al.*, 2017). Lipoproteínas associadas à membrana (do inglês, membrane-associated lipoproteins) também foram associadas à citotoxicidade, culminando em morte celular devido ao aumento de óxido nítrico (ON) e à ativação de caspases (BAI *et al.*, 2013; NI *et al.*, 2015). Além disso, a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) através do metabolismo de glicerol foi outro aspecto importante relacionado à virulência de *M. hyopneumoniae* (GALVAO FERRARINI *et al.*, 2018), o que pode também contribuir para os danos ao epitélio respiratório de suínos infectados com *M. hyopneumoniae* (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020).

Outro fator também associado com a patogenicidade de *M. hyopneumoniae* é a formação de biofilmes. A formação de biofilmes por *M. hyopneumoniae* foi vinculada a resistência de antibióticos ainda em altas concentrações (TASSEW *et al.*, 2017). Posteriormente, foi demonstrado que DNA extracelular de *M. hyopneumoniae* está associado com a formação de biofilmes em superfície abiótica e em células epiteliais de suínos (RAYMOND *et al.*, 2018).

A resposta imune dos suínos frente à infecção de *M. hyopneumoniae* também contribui para os danos ao trato respiratório desses animais (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). A resposta inflamatória exacerbada gerada durante a infecção por *M. hyopneumoniae* leva ao rompimento da homeostase celular e

lesões pulmonares (SUMMERFIELD, 2020). De fato, foi demonstrado o estímulo de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , dentre outros) induzidos por *M. hyopneumoniae* durante infecção natural ou experimental (AHN *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2020; LORENZO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2023), bem como a indução de citocinas pró-inflamatórias e ON em macrófagos murinos (DAMTE *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2011).

*M. hyopneumoniae* também apresenta a capacidade de imunomodulação e evasão do sistema imune, o que leva a persistência da bactéria no hospedeiro (KUHNERT; JORES, 2020). Foi demonstrado que a exposição de células dendríticas a *M. hyopneumoniae* induz a produção de altos níveis de IL-10, favorecendo a resposta Th2, o que pode levar ao desenvolvimento da doença (SHEN *et al.*, 2017). Outro fator que pode contribuir para a imunomodulação é a citotoxicidade gerada pela infecção de *M. hyopneumoniae*, uma vez que esse processo pode desencadear apoptose de células do sistema imune do hospedeiro (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). Além disso, já foi demonstrado *in vitro* que *M. hyopneumoniae* apresenta a capacidade de evadir de macrófagos de suínos (DEENEY *et al.*, 2019).

### 1.3. Estudos comparativos de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*

Através de comparações morfológicas é possível observar diferenças ao nível celular em espécies patogênicas e não patogênicas (YANG; BLAIR; SALAMA, 2016). Comparações morfológicas foram avaliadas anteriormente para células de *M. hyopneumoniae* de *M. flocculare*. Essas bactérias apresentaram tamanho e forma das células diferentes, considerando distintas fases de multiplicação *in vitro* (HOVIND-HOUGEN; FRIIS, 1991).

Os genomas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. hyopneumoniae* J foram inicialmente sequenciados e comparados por Vasconcelos *et al.* (2005). Nesse estudo, foram identificadas regiões específicas e variações no número de repetições em tandem de nucleotídeos em sequências codificadoras de fatores de virulência. Tais diferenças poderiam influenciar na variação antigênica e funcional dos fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* 7448 e J. Posteriormente, Siqueira *et al.* (2013) avaliaram e compararam os genomas de *M. hyopneumoniae* (7448 e

J) e *M. flocculare*. Os genomas de *M. hyopneumoniae* (7448 e J) e *M. flocculare* variaram de 764 a 920 kb em tamanho e apresentaram de 585 a 716 sequências codificadoras (abreviado em inglês como CDSs). Considerando esses dados para *M. hyopneumoniae* 7448, *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*, 41,6%, 40,6% e 39,1% de seus repertórios de CDSs foram relacionadas a proteínas hipotéticas, respectivamente.

Apesar das diferenças de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, semelhanças foram identificadas comparando os genomas dessas bactérias. *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* compartilharam aproximadamente 78% de suas CDSs e cerca de 90% das proteínas de superfície preditas (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Além disso, a maior parte das CDSs de fatores de virulência conhecidos para *M. hyopneumoniae* 7448 também foram identificadas para *M. hyopneumoniae* J (FERREIRA; DE CASTRO, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2005), e para *M. flocculare* (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Algumas diferenças também podem ser destacadas comparando os genomas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Por exemplo, *M. flocculare* não apresenta ortólogos para uma cópia das adesinas P97 e P102 (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Além disso, o domínio R1 da P97 (cópia 2), associado à virulência de *M. hyopneumoniae*, está ausente para *M. flocculare*. Uma outra diferença identificada é a ausência do gene codificador de glicerol-3-fosfato oxidase (glpO) em *M. flocculare*, o qual já foi associado ao metabolismo de glicerol em *M. hyopneumoniae* (GALVAO FERRARINI *et al.*, 2018), sendo considerado um fator de virulência para esta espécie. Diferenças entre alguns genes ortólogos codificadores de proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* também foram evidenciadas (LEAL *et al.*, 2016). Grande parte das sequências ortólogas avaliadas apresentaram domínios diferenciais entre elas, devido à presença/ausência de aminoácidos e/ou devido aos domínios divergentes (diferenças de identidade em trechos de aminoácidos). Tais diferenças poderiam implicar em propriedades imunológicas distintas, como de fato foi observado para duas regiões ortólogas de proteínas hipotéticas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* que induziram respostas celulares diferentes em camundongos.



A expressão de genes de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* também foi avaliada (SIQUEIRA *et al.*, 2014). De forma geral, foi identificado que mais de 90% dos genes preditos para *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* foram transcritos. Além disso, também foi observado que aproximadamente 80% e 94% dos genes mapeados de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, respectivamente, apresentaram um nível de expressão alto, incluindo genes codificadores de adesinas e proteínas associadas ao metabolismo basal. Embora a análise transcritômica tenha sido relevante para o conhecimento da expressão gênica de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, os dados gerados não foram suficientes para explicar as diferenças de patogenicidade dessas bactérias.

Estudos proteômicos comparativos também foram conduzidos para *M. hyopneumoniae* (7448 e 7422) e *M. hyopneumoniae* J (PAES *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2009), e para *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* (PAES *et al.*, 2018). Pinto *et al.* (2009) demonstraram uma maior expressão de proteínas para as patogênicas *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. hyopneumoniae* 7422 em comparação com a não patogênica *M. hyopneumoniae* J, incluindo adesinas e proteínas de resposta ao estresse. Posteriormente, Paes *et al.* (2018) evidenciaram diferenças qualitativas comparando os proteomas de *M. hyopneumoniae* (7448 e J) e *M. flocculare*, como a presença/ausência de algumas proteínas ortólogas na fração de citoplasma e/ou de superfície e algumas diferenças de abundância de fatores de virulência para as linhagens/espécies avaliadas. De forma geral, as diferenças de abundância de proteínas relacionadas à virulência poderiam explicar, até certo ponto, as diferenças de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Paes *et al.* (2018) também validaram genes previamente relacionados a proteínas hipotéticas, sendo os produtos desses genes validados como “proteínas não caracterizadas”. Algumas dessas proteínas também apresentaram diferenças de abundância entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, incluindo proteínas não caracterizadas com domínios funcionais relacionados à virulência.

Secretomas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* também foram comparados (PAES *et al.*, 2017). Dos fatores de virulência até então conhecidos, 15 foram identificados no secretoma de *M. hyopneumoniae*, incluindo adesinas, lipoproteínas e nucleases. Em contrapartida, apenas 4 proteínas associadas aos

fatores de virulência foram identificadas no secretoma de *M. flocculare*, das quais duas delas (adesina P102 e enzima de modificação de DNA) foram compartilhadas com *M. hyopneumoniae*. De forma geral, esses dados evidenciaram que o secretoma de *M. hyopneumoniae* foi enriquecido com fatores de virulência em relação ao secretoma de *M. flocculare*, o que pode contribuir para a patogenicidade de *M. hyopneumoniae*.

Modificações pós-traducionais também já foram avaliadas para adesinas de *M. hyopneumoniae* 7448 e J (PINTO *et al.*, 2009), e de *M. hyopneumoniae* (7448 e J) e *M. flocculare* (MACHADO *et al.*, 2020). De forma geral, sítios de clivagens distintos entre as linhagens/espécies, bem como a identificação de processamento endoproteolítico diferencial entre frações subcelulares (citoplasma e superfície) foram identificados para adesinas avaliadas. O processamento proteolítico diferencial em proteínas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* pode levar a diferentes apresentações de epítopos e domínios funcionais na superfície dessas bactérias, o que pode culminar em diferentes interações com hospedeiro suíno (LEAL ZIMMER *et al.*, 2020). Com base nesses achados, revela-se a importância da identificação de modificações pós-traducionais em outras proteínas de *M. hyopneumoniae* que possam estar associadas à sua patogenicidade, como é o caso das proteínas de função desconhecida (PUFs).

## 2. JUSTIFICATIVAS

A suinocultura apresenta uma grande relevância econômica no mundo, com uma projeção para o mercado de carne suína global de mais de 400 bilhões de dólares até 2028 (Research and Markets, 2023). O Brasil é considerado o quarto maior produtor e exportador de carne suína (AgênciaFPA, 2022), o que o torna um importante país no cenário da suinocultura mundial. De forma geral, a indústria suína sofre grandes perdas econômicas decorrentes da PES. As perdas econômicas podem ser ainda maiores em casos em que os animais infectados com *M. hyopneumoniae* apresentam coinfeções com outros microrganismos (MAROIS-CRÉHAN *et al.*, 2020). Dessa forma, avaliar os possíveis mecanismos associados ao desenvolvimento da PES, bem como adotar medidas de controle adequadas, são necessários para evitar infecções por *M. hyopneumoniae*.

A complexidade associada à patogenicidade e à virulência de *M. hyopneumoniae* levam à necessidade de uma melhor compreensão acerca dessa bactéria e de suas interações com os suínos na PES. Nesse contexto, o repertório de proteínas hipotéticas ou não caracterizadas de *M. hyopneumoniae* (PAES *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2022; VASCONCELOS *et al.*, 2005), também relacionadas como PUFs, representa um grupo a ser melhor investigado quanto ao seu potencial envolvimento com a PES. Estudos proteômicos comparativos demonstraram diferenças quali-quantitativas entre os repertórios de proteínas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, incluindo PUFs (PAES *et al.*, 2018). Dentre essas, houveram ortólogas diferenciadamente expressas entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Além disso, muitas PUFs estiveram entre as proteínas mais abundantes na superfície de *M. hyopneumoniae*. Com isso, o conjunto de PUFs de *M. hyopneumoniae* pode estar associado a interações moleculares e mecanismos de patogenicidade ainda desconhecidos, especialmente as PUFs de superfície.

O processamento pós-traducional diferencial de proteínas de superfície entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* também pode estar associado às diferenças de patogenicidade entre essas espécies. Portanto, a avaliação de processamento endoproteolítico diferencial em PUFs de *M. hyopneumoniae* e *M.*

*flocculare* também é importante para avaliar se essas proteínas e/ou proteoformas derivadas são apresentadas diferencialmente na superfície, expondo diferentes epítomos e domínios funcionais e, conseqüentemente, apresentando uma interação diferencial com o hospedeiro suíno. Além disso, a identificação de domínios diferenciais em PUFs ortólogas de superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* também é importante, pois também podem desempenhar possíveis implicações diferenciais com o hospedeiro suíno.

Uma melhor compreensão dos mecanismos associados à patogenicidade de *M. hyopneumoniae* também é necessária para que se adote e/ou melhore as medidas de controle da PES. Sendo assim, a identificação e a caracterização de novas proteínas ou domínios proteicos de superfície de *M. hyopneumoniae*, como PUFs, podem revelar propriedades antigênicas e/ou imunogênicas dessas moléculas. Assim, essas moléculas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e vacinas que gerem uma maior proteção contra *M. hyopneumoniae*.

Embora existam kits comerciais de ELISA para a imunodeteção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, as sensibilidades de alguns testes foram avaliadas como não significativas (SILVA *et al.*, 2020; ERLANDSON *et al.*, 2005). No contexto de infecções por *M. hyopneumoniae*, testes sorológicos mais sensíveis podem auxiliar na decisão de medidas para controlar ou eliminar a doença (GARCIA-MORANTE *et al.*, 2022). Portanto, é relevante a busca por novos antígenos que ofereçam testes sorológicos mais sensíveis para a detecção de *M. hyopneumoniae*. Com isso, o conjunto PUFs de superfície de *M. hyopneumoniae* também pode apresentar candidatos com potencial sorológico para a imunodeteção de *M. hyopneumoniae*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar *in silico* PUFs dominantes na superfície de *M. hyopneumoniae* 7448 e ortólogas de *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*, e caracterizar imunologicamente segmentos de proteoformas diferenciais derivadas das PUFs de *M. hyopneumoniae*.

#### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Descrever quali-quantitativamente o repertório de PUFs de superfície de *M. hyopneumoniae* 7448 não previamente relacionadas à adesão.

3.2.2. Identificar proteoformas derivadas destas proteínas geradas a partir de eventos de processamento endoproteolítico.

3.2.3. Comparar *in silico* as proteínas e proteoformas identificadas com ortólogas de linhagem não patogênica de *M. hyopneumoniae* e de *M. flocculare*.

3.2.4. Caracterizar imunologicamente segmentos de proteoformas selecionados.

3.2.5. Avaliar o potencial de imunodeteção dos segmentos de proteoformas selecionados.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A seção 4.1. é referente ao artigo publicado no periódico *Heliyon* em 2023, que descreve a identificação de domínios diferenciais e processamento endoproteolítico em PUFs dominantes na superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. A seção 4.2. é referente ao manuscrito submetido ao periódico *Veterinary Microbiology*, que descreve a caracterização imunológica de dois segmentos de proteoformas dominantes na superfície de *M. hyopneumoniae*. Ambos os documentos contêm os materiais e métodos, resultados e discussão.

4.1. Identificação de domínios diferenciais e processamento endoproteolítico em PUFs dominantes na superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*

Artigo publicado no periódico *Heliyon* em 2023

(DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16141>)

Título: *Differential domains and endoproteolytic processing in dominant surface proteins of unknown function from Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare*

**Autores:**

Priscila Souza dos Santos, Jéssica Andrade Paes, Lais Del Prá Netto Machado, Gabriela Prado Paludo, Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer Ferreira

**Contribuições dos autores:**

PSS: projetou os experimentos, realizou os experimentos, analisou e interpretou os dados, escreveu o artigo. JAP: projetou os experimentos, analisou e interpretou os dados, escreveu o artigo. LDPNM e GPP: realizou os experimentos, analisou e interpretou os dados; AZ e HBF: projetou os experimentos, analisou e interpretou os dados, escreveu o artigo.

Material suplementar disponível em: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)033480?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023033480%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)033480?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023033480%3Fshowall%3Dtrue)



## Research article

# Differential domains and endoproteolytic processing in dominant surface proteins of unknown function from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*

Priscila Souza dos Santos<sup>a,b</sup>, Jéssica Andrade Paes<sup>a,b</sup>,  
Lais Del Prá Netto Machado<sup>a,b</sup>, Gabriela Prado Paludo<sup>a,b</sup>, Arnaldo Zaha<sup>a,b,c,d</sup>,  
Henrique Bunselmeyer Ferreira<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brazil



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Porcine enzootic pneumonia  
Proteins of unknown function  
Endoproteolytic processing  
Differential proteoforms  
Pathogenicity

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* causes porcine enzootic pneumonia (PEP), a chronic respiratory disease that leads to severe economic losses in the pig industry. Swine infection and PEP development depend on the adhesion of the pathogen to the swine respiratory tract and the host immune response, but these and other disease determinants are not fully understood. For instance, *M. hyopneumoniae* has a large repertoire of proteins of unknown function (PUFs) and some of them are abundant in the cell surface, where they likely mediate so far unknown pathogen-host interactions. Moreover, these surface PUFs may undergo endoproteolytic processing to generate larger repertoires of proteoforms to further complicate this scenario. Here, we investigated the five PUFs more represented on the surface of *M. hyopneumoniae* pathogenic strain 7448 in comparison with their orthologs from the nonpathogenic *M. hyopneumoniae* J strain and the closely related commensal species *Mycoplasma flocculare*. Comparative *in silico* analyses of deduced amino acid sequences and proteomic data identified differential domains, disordered regions and repeated motifs. We also provide evidence of differential endoproteolytic processing and antigenicity. Phylogenetic analyses were also performed with ortholog sequences, showing higher conservation of three of the assessed PUFs among *Mycoplasma* species related to respiratory diseases. Overall, our data point out to *M. hyopneumoniae* surface-dominant PUFs likely associated with pathogenicity.

## 1. Introduction

*Mycoplasma hyopneumoniae* causes porcine enzootic pneumonia (PEP), a chronic respiratory disease that leads to major economic

**Abbreviations:** CDS: Coding DNA sequence, EC: epitope coverage; PEP: porcine enzootic pneumonia, PUF: protein of unknown function.

\* Corresponding author. Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa Postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: [henrique.bunselmeyer@ufrgs.br](mailto:henrique.bunselmeyer@ufrgs.br) (H.B. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16141>

Received 19 September 2022; Received in revised form 28 April 2023; Accepted 6 May 2023

Available online 18 May 2023

2405-8440/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



losses in the pig industry [1]. This bacterium adheres to the epithelium of the porcine respiratory tract inducing cilia loss and epithelial cell death [2]. Infected pigs present clinical signs such as cough, fever and respiratory distress, and their average daily gain and feed conversion ratios are severely affected [3]. Moreover, *M. hyopneumoniae*-infected swine are also more susceptible to coinfections with viruses and other bacteria, which may lead to the development of porcine respiratory disease complex (PRDC) [4].

*M. hyopneumoniae* pathogenicity mechanisms form a complex scenario, in which bacterial and host molecules are involved in PEP establishment [5]. The virulence degree is variable among *M. hyopneumoniae* strains, ranging from the virtually avirulent strain J to high virulent strains, such as 232, 7448, 7422 and ES-2 [6–9]. Several *M. hyopneumoniae* surface proteins have been associated with relevant features for host-pathogen interactions, such as mycoplasma adhesion to the porcine respiratory tract, cytotoxicity and host immunomodulation [10]. Moreover, the occurrence of post-translational endoproteolytic processing among surface proteins from different *M. hyopneumoniae* strains have been addressed by some previous proteomic studies [11–18]. Differential endoproteolytic processing was also demonstrated for adhesion-related proteins between *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, which is a closely related *Mycoplasma* species that cohabitates the porcine respiratory tract but is nonpathogenic [19]. The endoproteolytic processing is assumed to generate a combinatorial library of proteoforms, diversifying the bacterial surface [2,19]. Such diversification would have many implications for pathogen-host interactions.

The *M. hyopneumoniae* cell surface contains many proteins with assigned functions, such as adhesins, membrane transporters, enzymes, and immunomodulatory antigens [10]. However, about 35% of the genes coding for surface proteins in the genome of *M. hyopneumoniae* have been originally annotated as hypothetical proteins, with no assigned functions [7–9]. More recently, efforts have been carried out to improve coding DNA sequence (CDS) validation and genome annotation in *M. hyopneumoniae* 7448 [20,21], but many CDSs still code for proteins of unknown function (PUFs) and require further characterization, especially those enriched on the cell surface.

Interestingly, the comparative proteomics analyses demonstrated quali-quantitative differences among the repertoires of detected PUFs from *M. hyopneumoniae* pathogenic and nonpathogenic strains and from the commensal *M. flocculare* [21]. These strains and species have orthologs for more than 90% of the repertoire of predicted surface proteins [8,9]. Thus, we hypothesized that *M. hyopneumoniae* 7448 dominant surface PUFs differ in at least some aspects from their orthologs in nonpathogenic counterparts, such as *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*, and that these differences are relevant for *M. hyopneumoniae* pathogenicity.

Here, we investigated the five PUFs more represented on the surface of *M. hyopneumoniae* 7448 in comparison with their orthologs from *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*. The aim of the study was to identify differential features among these orthologs, including distinct structural and functional domains, differential endoproteolytic processing, and epitope repertoires. Overall, the performed *in silico* analyses, provided evidence of structural and immunological differences, whose implications for *M. hyopneumoniae* virulence and pathogenicity are discussed. Moreover, phylogenetic analyses were performed to provide information on the evolutive history of these proteins among mycoplasmas and other bacteria.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* PUFs and associated LC-MS/MS data

LC-MS/MS data from proteins detected in *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* surface or cytoplasm-enriched protein extracts (from now on referred just as ‘surface samples’ or ‘cytoplasm samples’, respectively) were previously generated [21]. A total of 59 *M. hyopneumoniae* 7448 PUFs were identified in the LC-MS/MS data from surface samples and had the corresponding LC-MS/MS data retrieved, along with that of their *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* orthologs. Surface ortholog PUF sets of *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* were defined as orthogroups (OGs) for the subsequent analyses. From the 59 OGs, 54 were assessed in the performed studies (Table S1); the other 5 OGs, have been previously related to adhesion and were addressed in a previous study [19], and were not included in this study. The available normalized spectral abundance factor (NSAF) values [21] were then used for quantitative comparisons and to rank PUFs according to their abundances in surface samples. The top five most abundant *M. hyopneumoniae* 7448 surface PUFs and their orthologs of *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*, from now on referred as MHPn, MHJn and MFn, respectively, being ‘n’ the OG number, were then selected for further analyses. Information regarding detected peptide sequences in surface and cytoplasmic samples, their corresponding spectral counts and sequence coverages for these 5 OGs were also retrieved from our previously published data [21]. The full-length deduced amino acid sequences of each assessed PUF and associated information were recovered from UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

### 2.2. Identification of differential domains between ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* strains and *M. flocculare*

Pairwise Sequence Alignment using Needleman-Wunsch algorithm ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) was utilized to compare ortholog PUFs within each assessed OG. GeneDoc version 2.7 (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>) was used to customize the alignments. Differential domains were defined based on previously established criteria [22], being considered as such insertions/deletions of at least 5 aa in one sequence and absent in their orthologs, and/or segments with at least 10 aa with  $\leq 30\%$  of identity between orthologs with overall identities  $\geq 50\%$ .

**Table 1**Orthogroups corresponding to the top 5 most represented surface PUFs in *M. hyopneumoniae* 7448 and their orthologs from *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*.

Orthogroup (OG) <sup>b</sup>	<i>M. hyopneumoniae</i> 7448		<i>M. hyopneumoniae</i> J		<i>M. flocculare</i>		PUFs rank <sup>d</sup>			Overall rank <sup>e</sup>		
	ID <sup>b</sup>	NCBI accession number <sup>c</sup>	ID <sup>b</sup>	NCBI accession number <sup>c</sup>	ID <sup>b</sup>	NCBI accession number <sup>c</sup>	<i>M. hyopneumoniae</i> 7448	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. flocculare</i>	<i>M. hyopneumoniae</i> 7448	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. flocculare</i>
OG1	MHP1	MHP7448_0489	MHJ1	MHJ_0486	MF1	MFC_00856	1	8	6	34	103	24
OG2	MHP2	MHP7448_0352	MHJ2	MHJ_0347	MF2	MFC_01239	2	1	5	39	28	22
OG3	MHP3	MHP7448_0538	MHJ3	MHJ_0540	MF3	MFC_00551	3	3	23	47	42	77
OG4	MHP4	MHP7448_0138	MHJ4	MHJ_0134	MF4	WP_231237874.1	4	7	ND	49	68	ND
OG5	MHP5	MHP7448_0483	MHJ5	MHJ_0480	MF5	MFC_01450	5	11	ND	50	109	ND

<sup>a</sup> Groups of ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* 7448, *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*.<sup>b</sup> Identification of the PUFs from *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare*, according to the OG number.<sup>c</sup> Accession numbers in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).<sup>d</sup> According to the abundance (NSAF values) of the selected PUFs in the corresponding surface samples [21].<sup>e</sup> According to the abundance (NSAF values), considering all proteins detected in surface samples [21].

### 2.3. Topology predictions, and identification and comparison of disordered regions and repeated motifs in ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* strains and *M. flocculare*

The full-length deduced amino acid sequences of the assessed ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* 7448 and J, and *M. flocculare* were used for topology predictions by the Protter software (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) and for predictions of disordered regions by the Predictor of Natural Disordered Regions (PONDR®) algorithm VSL2 (<http://www.pondr.com/>) using a PONDR Score  $\geq 0.5$ .

The search for fixed-length motifs was initially performed with the full-length deduced amino acid sequences of the *M. hyopneumoniae* 7448 assessed PUFs using Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) with default parameters (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). The MEME-defined consensus of the repeated motifs identified in *M. hyopneumoniae* 7448 PUFs were then used to identify matches in ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* 7448 and J strains and *M. flocculare* with the Motif Alignment & Search Tool (MAST) with default parameters (<https://meme-suite.org/meme/tools/mast>).

### 2.4. Validation and mapping of peptides detected by LC-MS/MS, and identification of endoproteolytic processing events in ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*

Peptides detected by LC-MS/MS in surface and cytoplasmic samples corresponding to the PUFs within each assessed OG were recovered from our previously published data [21]. They were then validated based on the detection in at least two out of three biological replicates, as previously described [19]. The relative abundance of each validated peptide for a given PUF was inferred from the correspondent average of the peptide's exclusive unique spectral counts in the biological replicates. Validated peptides were physically mapped to the cognate PUF deduced amino acid sequences.

Endoproteolytic processing events were identified based on the detection of non-tryptic cleavage sites in mapped peptides [19]. Proteoforms were defined here as being any protein stretch covered by two or more overlapping or juxtaposed mapped peptides, and with its amino and/or carboxy-terminal ends generated by a non-tryptic cleavage event.

### 2.5. Differential endoproteolytic processing in *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* ortholog PUFs and between subcellular compartments

Differential endoproteolytic processing was identified through alignments of the ortholog PUFs of *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* in surface and cytoplasmic protein samples. For this, stretches with 10 aa that comprised the non-tryptic cleavage site in a strain/species were aligned with corresponding stretches of the ortholog PUFs using the ClustalW algorithm from the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (<https://www.megasoftware.net/>), with default parameters.

Differential endoproteolytic processing between *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* was assumed when a stretch covered by semi-tryptic peptides in a strain/species was absent in the corresponding mapped stretch of the ortholog(s). Likewise, differential endoproteolytic processing between subcellular fractions was assumed when a stretch covered by semi-tryptic peptides in the surface fraction was absent in the corresponding mapped stretch of the same protein in the cytoplasmic fraction, or vice versa.

### 2.6. Epitope predictions

Epitope predictions for the PUFs in each assessed OG were carried out using the Predicting Antigenic Peptides tool (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>). For these predictions, the full-length deduced amino acid sequences of each PUF were used. Epitope coverage (EC) was defined as the percentage of the whole protein or derived proteoform covered by identified antigenic peptides.

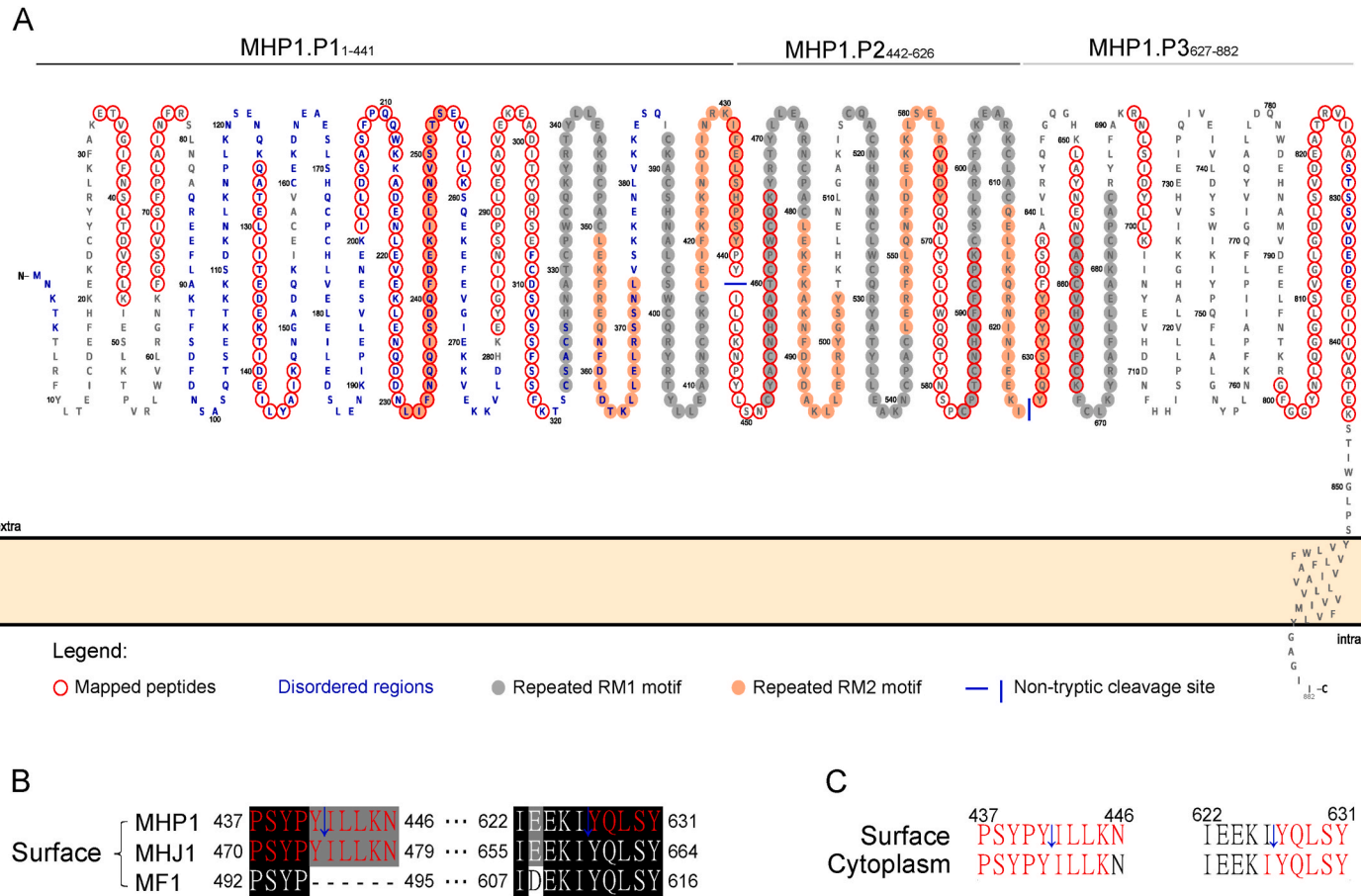
### 2.7. Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed in order to investigate the evolutionary history among *M. hyopneumoniae* 7448 PUFs and orthologs PUFs. The full-length deduced amino acid sequences of *M. hyopneumoniae* 7448 were used to retrieve ortholog sequences from the NCBI protein database (March 2022) using the BLASTp tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The initial parameters used to search for orthologs were  $\geq 30\%$  identity with and  $\geq 60\%$  coverage of the query sequence. When necessary, an additional criterion of protein size variation  $\leq 30\%$  in relation to the query was used. The ClustalW algorithm from the MEGA software was used to perform multiple sequence alignments, with default parameters. MEGA was also used to estimate the best substitution model based on Bayesian Information Criterion (BIC), and to build the phylogenetic trees. The trees were built by the Maximum Likelihood method and with 2000 bootstrap replicates. FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was used for the customization of the built phylogenetic trees.

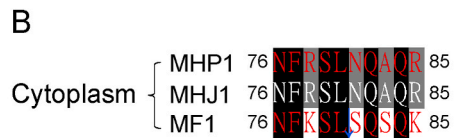
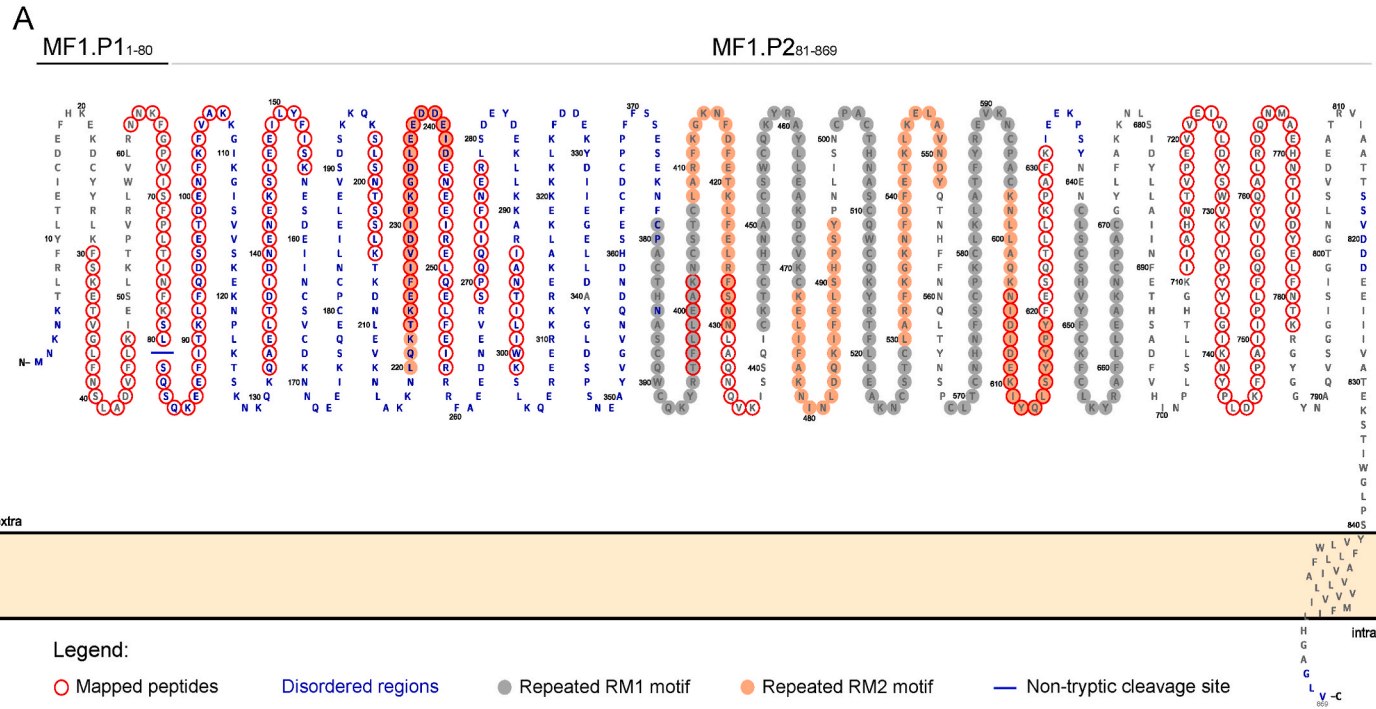
## 3. Results

### 3.1. Selection of the top five most represented PUFs on the *M. hyopneumoniae* 7448 cell surface

Previous LC-MS/MS data were utilized in order to rank and select the five PUFs most represented on *M. hyopneumoniae* 7448 surface, and their orthologs from *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*. OGs were ordered from 1 to 5 according to the PUF abundance on the *M. hyopneumoniae* 7448 surface, as shown in Table 1. The five most represented *M. hyopneumoniae* 7448 surface PUFs were



**Fig. 1.** MHP1 structural features, endoproteolytic processing, derived proteoforms and differential processing between strains/species and subcellular fractions. (A) MHP1 amino acid sequence and corresponding structural features; N- and C-terminal ends are indicated, and amino acid residue positions are numbered. MHP1 was endoproteolytically processed in two cleavage sites (blue bars) on the surface to generate three proteoforms. (B) Amino acid sequence alignments of the MHP1 endoproteolytic processing sites with the corresponding sites from the MHJ1 and MF1 orthologs in surface. (C) MHP1 differential endoproteolytic processing between surface and cytoplasm fractions. For (B) and (C): amino acids in red are from peptides detected by LC-MS/MS; amino acids in black or white are from peptides not detected by LC-MS/MS; non-tryptic cleavage sites were indicated by blue arrows, and amino acid residue positions are numbered. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 2.** MF1 structural features, endoproteolytic processing, derived proteoforms and differential processing between strains/species. (A) MF1 amino acid sequence and corresponding structural features; N- and C-terminal ends are indicated, and amino acid residue positions are numbered. MF1 was endoproteolytically processed in a single cleavage site (blue bar) on the cytoplasm to generate two proteoforms. (B) Amino acid sequence alignments of the MF1 endoproteolytic processing site with the corresponding site from the MHP1 and MHJ1 orthologs in cytoplasm. Amino acids in red are from peptides detected by LC-MS/MS; amino acids in white are from peptides not detected by LC-MS/MS; the non-tryptic cleavage site was indicated by a blue arrow, and amino acid residue positions are numbered. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

ranked from 34th to 50th in the overall rank of the total of 267 proteins detected by LC-MS/MS in surface-enriched protein samples. Most of the rank positions of the top five *M. hyopneumoniae* 7448 surface PUFs were not the same for their *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* orthologs, which ranked among the 109 and 77 most abundant surface proteins, respectively.

### 3.2. Identification of differential domains among ortholog surface PUFs from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*

The *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* ortholog PUFs were assessed to search for possible differential domains (Table S2). Between *M. hyopneumoniae* 7448 and *M. hyopneumoniae* J orthologs, only orthologs from OG1 and OG4 presented differential domains (one and three, respectively) (Table S2A). More differential domains were found in the comparisons between *M. hyopneumoniae* 7448 and *M. flocculare* orthologs, with OGs1-5 exhibiting from one (in OG5) to 19 (in OG1) (Table S2B), and between *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare*, with OGs1-5 exhibiting from one (in OG5) to 23 (in OG1) (Table S2C).

### 3.3. Identification and comparison of disordered regions and repeated motifs among ortholog surface PUFs from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*

The top five *M. hyopneumoniae* 7448 surface PUFs were assessed in the search for disordered regions and repeated motifs. All ortholog sequences from OGs1-5 exhibited numbers of disordered regions ranging from 5 (in OG5 for MHP5 and MHJ5) to 25 (in OG4 for MF4), with different numbers of amino acids in length, ranging from 1 to 261 aa (Table S3).

Repeated motifs, in turn, were found only in MHP1. In this PUF, the MEME search identified two repeated motifs, with lengths of 29 aa (RM1) and 23 aa (RM2) (Fig. S1). The search for these repeated motifs in the members of OG1 revealed that RM1 and RM2 appear in juxtaposed blocks (RM1-RM2), repeated five times in MHP1 and MHJ1, and four times in MF1 (Fig. S2; Table S3). These juxtaposed repeated blocks are followed by an additional individual copy of RM1 towards the C-terminal end in the three OG1 orthologs, 22 aa away from the block formed by the remaining repeated motifs. Moreover, an additional individual copy of RM2 was found towards the N-terminal end of these three orthologs, 68 aa away from the remaining repeated motifs for MHP1 and MJ1, and 136 aa away from the remaining repeated motifs for MF1. The repeated RM1-RM2 sets are regularly interspaced in the three orthologs, being 12–15 aa apart from each other in MHP1 and MHJ1, and 6–15 in MF1 (Fig. S2; Table S3).

### 3.4. Endoproteolytic processing and identification of differential proteoforms derived from the ortholog *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* PUFs

Validated peptides and associated quali-quantitative proteomic data corresponding to the *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* PUFs in surface protein samples and cytoplasmic protein samples were recovered from previously performed LC-MS/MS studies (Tables S4A–C and S5A–C, respectively). Endoproteolytic processing sites were then inferred from the identification of semi-tryptic peptides.

For OG1 in surface samples, only MHP1 was processed, as two non-tryptic cleavage sites (PSYPY↓ILLKN and IEEKI↓YQLSY) were identified in this PUF (Fig. 1A; Table S4A). These cleavage sites do not coincide with any of the putative disordered regions predicted for MHP1. The processing potentially generates N-terminal, central, and C-terminal proteoforms, respectively called MHP1.P1<sub>1-441</sub>, MHP1.P2<sub>442-626</sub>, and MHP1.P3<sub>627-882</sub>, with the last one comprehending a transmembrane domain (Fig. 1A). Each of these predicted proteoforms includes different numbers of the repeated RM1 and RM2 motifs found for MHP1. The two cleavage sites found in MHP1 (PSYPYILLKN and IEEKIYQLSY) presented 100% of conservation in the considered 10 aa-stretches with MHJ1 (Fig. 1B). However, no evidence of cleavage was found for MHJ1, as the PSYPYILLKN site was covered only by a tryptic peptide, and no peptides covering the IEEKIYQLSY were mapped. In the MF1 ortholog, the C-terminal part of the PSYPYILLKN is absent and no peptides covering the IDEKIYQLSY were mapped (Fig. 1B). Overall, these findings point out to differential endoproteolytic processing of the MHP1, MHJ1 and MF1 orthologs. Moreover, the absence of any semi-tryptic peptide mapped to the PSYPYILLKN or IEEKIYQLSY sites in cytoplasmic samples suggests differential endoproteolytic processing for this *M. hyopneumoniae* 7448 PUF between subcellular fractions (Fig. 1C).

For OG1 in cytoplasmic samples, endoproteolytic processing was found only in MF1 (Fig. 2A; Table S5C). A single non-tryptic cleavage site was identified for MF1 (NFKSL↓SQSQK), potentially generating a N-terminal MF1.P1<sub>1-80</sub> proteoform and a C-terminal MF1.P2<sub>81-869</sub> proteoform comprehending a transmembrane domain (Fig. 2A). This non-tryptic cleavage site coincides with a disordered region (79–339) predicted for MF1. MF1.P2<sub>81-869</sub> proteoform included all repeated RM1 and RM2 motifs found for MF1. The NFKSLSQSQK site in MF1 is only partially conserved (60% identity) in MHP1 and MHJ1 orthologs, and peptides covering this site were mapped only for MHP1 (Fig. 2B). This suggests differential endoproteolytic processing between MF1 and MHP1.

For OG2 in surface samples, endoproteolytic processing was found only in MF2 (Fig. S3A; Table S4C). A single non-tryptic cleavage site was identified for MF2 (IHKQL↓QLSA), resulting potentially in a N-terminal MF2.P1<sub>1-562</sub> proteoform and a C-terminal MF2.P2<sub>563-701</sub> proteoform (Fig. S3A). This cleavage site does not coincide with any of the putative disordered regions predicted for MF2. The IHKQLQLSA site in MF2 is 100% conserved (regarding the considered 10 aa-stretch) in the MHP2 and MHJ2 orthologs and none of the mapped peptides covering this region for both was indicative of a non-tryptic cleavage event (Fig. S3B). This suggests differential endoproteolytic processing involving OG2 between *M. flocculare* and *M. hyopneumoniae*. Moreover, the absence of any semi-tryptic peptide covering the IHKQLQLSA site for MF2 in cytoplasmic samples suggests differential endoproteolytic processing for this *M. flocculare* PUF also between subcellular fractions (Fig. S3C).

For OG3 in surface samples, endoproteolytic processing was found only in MF3 (Fig. S4A; Table S4C). A single non-tryptic cleavage site was identified for MF3 (KNQLE↓QVDFS), resulting potentially in a N-terminal MF3.P1<sub>1-187</sub> proteoform and a C-terminal MF3.



P2<sub>188-278</sub> proteoform (Fig. S4A). This non-tryptic cleavage site coincides with a disordered region (185–200) predicted for MF3. The KNQLEQVDFS site in MF3 is partially conserved (80% identity) in MHP3 and MHJ3 orthologs, and was covered by mapped peptides (Fig. S4B). This suggests differential endoproteolytic processing in the OG3, between *M. flocculare* and *M. hyopneumoniae*. Moreover, the absence of any semi-tryptic peptide mapped to the KNQLEQVDFS site for MF3 in cytoplasmic samples suggests differential endoproteolytic processing for this *M. flocculare* PUF also between subcellular fractions (Fig. S4C). The overall results providing evidence of differential endoproteolytic processing involving the PUF OGs1-5 are summarized in Table S6.

### 3.5. Epitope predictions for *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* PUFs and derived surface proteoforms

*M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* PUFs and derived surface proteoforms were assessed for the prediction and mapping of epitopes, and to estimate EC. Predicted epitopes and their positions in the assessed PUFs are shown in Table S7A. For *M. hyopneumoniae* 7448, *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* PUFs from OGs1-5, from 7 to 37, 7 to 34, and 8 to 37 epitopes were predicted, respectively. The lengths of these epitopes ranged from 7 to 53 aa, for *M. hyopneumoniae* 7448, 7 to 55 aa, for *M. hyopneumoniae* J, and 7 to 48 aa, for *M. flocculare* (Table S7A) and they are evenly distributed along the proteins/proteoforms (data not shown). Several predicted epitopes were conserved among the ortholog PUFs, predominantly between *M. hyopneumoniae* 7448 and J. Interestingly, some of the predicted epitopes were found within the RM1 and RM2 repeated motifs (highlighted in Table S7A).

ECs were then assessed, as at least some ortholog proteins/proteoforms differ considerably in length. Considering the full-length sequences of PUFs in OGs1-5, the ECs for *M. hyopneumoniae* (7448 and J) and *M. flocculare* PUFs were OG1 > OG3 > OG5 > OG4 > OG2 (Fig. 3). At least 60% of the MHP1, MHJ1 and MF1 sequences were predicted as antigenic, with MHP1 presenting the highest EC (68%). Within each OG, *M. hyopneumoniae* 7448 PUFs presented the highest ECs in comparison with the *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* ortholog PUFs. In the OG5, MHP5 and MHJ5 presented the same ECs, as they are 100% identical. EC differences were especially evident between *M. hyopneumoniae* 7448 and *M. flocculare* in all OGs, being always lower in the nonpathogenic species.

ECs were also assessed for the derived surface proteoforms of *M. hyopneumoniae* 7448 and *M. flocculare*. As shown in Table S7B, the ECs of the MHP1, MF2, and MF3 derived proteoforms ranged from 59% to 78%, 36%–39% and 31%–58%, respectively.

### 3.6. Phylogenetic analysis of the assessed ortholog surface PUFs

Phylogenetic trees were constructed in order to evaluate the evolutionary relationship among *M. hyopneumoniae* 7448 PUFs from OG1-5 and orthologs from other bacteria. With exception of *M. hyopneumoniae*, only one representative strain of each species was considered (Table S8), selected based on the higher identity and coverage of the orthologs with the query sequence (data not shown). Orthologs of MHP1-5 were found in totals of 4, 13, 17, 10 and 32 other bacterial species, respectively (Table S8). Orthologs were found essentially among some *Mycoplasma* species, with the exceptions of MHP3 and MHP5, for which orthologs were found also in a few bacteria from other unrelated genera. Leucine-rich repeat domains (LRRs) (Pfam CL0022) were observed among MHP3 orthologs, and two conserved domains with unknown functions (DUFs), namely DUF31 (Pfam PF01732) and DUF2714 (Pfam PF10896), were identified among several MHP4 and MHP5 orthologs, respectively (Table S8).

In the phylogenetic analysis, the MHP1 and MHP5 alignments generated by our select dataset did not support dependable trees. Phylogenetic trees were then built only for MHP2, MHP3 and MHP4 orthologs, and they are presented in Figs. S5–S7, respectively. As expected, these trees demonstrated a close relationship between the MHP2-4 PUFs and their corresponding *M. hyopneumoniae* J orthologs, which grouped into monophyletic clusters in all cases. Furthermore, other clusters including *M. flocculare*, *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma* sp. Moose\_RK orthologs displayed a similar and close evolutionary history, with paraphyletic relationships within the clade of species that colonize their hosts' respiratory system.

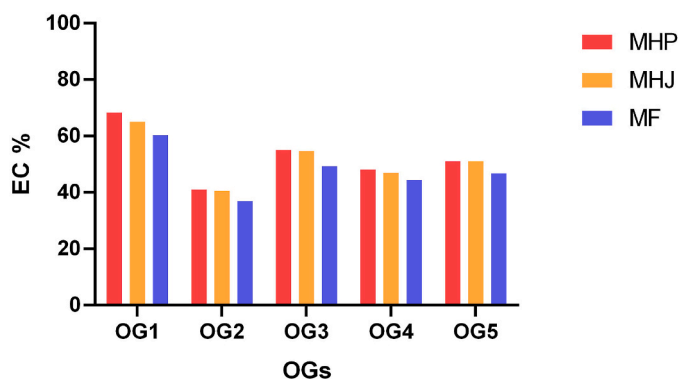


Fig. 3. ECs of the full-length amino acid sequences of PUFs from OGs1-5. ECs were measured for *M. hyopneumoniae* 7448 (MHP), *M. hyopneumoniae* J (MHJ) and *M. flocculare* (MF) PUFs in all OGs.

#### 4. Discussion

*M. hyopneumoniae* surface-exposed proteins are protagonists in the pathogen-host relationship, due to their roles in adhesion, cytotoxicity, and immunomodulation of host response [10]. Interestingly, a large fraction of these surface proteins still remains annotated as PUFs [20], and are likely a reservoir of novel uncharacterized PEP determinants. Several studies have pointed out that PUFs may play relevant roles in the biology of many bacterial species, including *Mycoplasma* spp., and their characterization may be useful to reveal novel virulence factors, and new targets for the development of vaccines and diagnostic tests [20,22–24].

Here, we addressed the five most represented PUFs on the surface of the pathogenic *M. hyopneumoniae* 7448 and their orthologs from nonpathogenic *M. hyopneumoniae* J strain and *M. flocculare*. These surface dominant proteins were selected for the present study based on previously available proteomic quali-quantitative data generated by our group [21]. Surface-displayed molecules, specially the more abundant ones, are expected to play key roles during the infectious process of pathogenic bacteria, as they directly interact with host molecules in the extracellular milieu [25]. In line with that, PUFs overrepresented on *M. hyopneumoniae* surface may be involved in pathogen-host interactions relevant to pathogenicity, including, but not limited to, cell adhesion and invasion, antigenic variation, immunomodulation, detoxification, nutrient uptake, cell signaling, biofilm formation and so on [10,26,27]. Interestingly, our results demonstrated that the corresponding ortholog PUFs from *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* are relatively less abundant on the cell surface, which is also suggestive of the importance of these proteins for the *M. hyopneumoniae* pathobiology. Moreover, endoproteolytic processing has been also investigated and revealed proteoforms derived from several surface proteins, including some PUF-derived [14,17–19,28,29]. Endoproteolytic processing is an important mechanism to modulate the protein content of the bacteria surface, with a direct impact on the interactions with the host. In our findings, the ortholog PUFs and their potential proteoforms differ in structural aspects that may influence the host-pathogen interaction, as discussed below.

Among the dominant PUFs in the *M. hyopneumoniae* surface and their *M. flocculare* orthologs, those in the assessed OGs1-5 differ in the type, the number and/or the distribution of protein domains. They occur in the form of amino acid stretches that are present/absent or are at least 70% divergent in sequence. The differences in domains were found within all OGs between the *M. hyopneumoniae* strains and *M. flocculare*, but were especially evident between these orthologs in OG1. Although these domains have not been functionally characterized so far, their differential presence or conservation among orthologs of surface full-length proteins or derived proteoforms, points out to functional differences with impact in host-pathogen interactions. Indeed, a previous study showed that differential domains between ortholog surface proteins from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* induced differential immune responses in immunized mice [22].

Further structural findings came from the predictions of disordered regions and repeated motifs. Putative disordered regions were identified for all ortholog PUFs from OGs1-5. Among those endoproteolytically processed, only MF1 (NFKSL↓SQSQK) and MF3 (KNQLE↓QVDFS) were processed in predicted regions of disorder. It is likely that these regions are more susceptible to post-translational modifications, including protease processing [30]. Disordered protein stretches are assumed to be more relaxed and consequently more exposed in the three-dimensional structure of proteins. Endoproteolytic processing associated with putative disordered regions has been also described for adhesins from *Mycoplasma* species [17,31–33].

Some of the assessed ortholog surface PUFs also presented differential repeated motifs. Such motifs were found within members of OG1, in the form of two repeat units named RM1 and RM2. These repeats are highly conserved (up to 100% identical) between MHP1 and MHJ1, but are absent or are less conserved (from 13 to 93% of identity) in the RM1 or RM2 repeats of *M. flocculare* orthologs. Besides these differences in sequences, there were also differences in the number and the distribution of these repeats among the proteins within OG1 and among the MHP1 and MF1-derived proteoforms, which may determine differential molecular interactions. Repeated sequences have been reported for some characterized proteins with important functional implications in *M. hyopneumoniae*, such as P97 and other adhesion-related proteins [34,35], and the membrane-associated lipoprotein P68 [36]. Moreover, motifs have been also identified in other *Mycoplasma* species for many surface proteins related to adherence to the host and virulence [33,37,38].

We also compared the endoproteolytic processing between the strains/species and subcellular compartments for *M. hyopneumoniae* 7448 (MHP1), and *M. flocculare* (MF1, MF2 and MF3). The identified cleavage sites in these PUFs presented no conservation with processed regions previously described for other *M. hyopneumoniae* proteins [14,17–19,28,29]. It has been demonstrated that several *M. hyopneumoniae* J surface proteins may also undergo endoproteolytic processing [14,19,39], with MHJ1 among them [39]. However, no such processing was detected neither for MHJ1 nor to MHJ2-5 in our findings. Several proteases from *M. hyopneumoniae* 7448 and J strains and *M. flocculare* have been identified and a few have been functionally characterized [8,9,40]. However, it remains unclear if any of them or other so far uncharacterized ones are responsible for the observed differential endoproteolytic processing. How the differential endoproteolytic processing is regulated and the importance of this processing for virulence-related aspects deserve more investigation.

Structural differences based on repeat variation and/or post-translational proteolytic processing have also been associated with mechanisms of *M. hyopneumoniae* surface protein variation [2,35]. The ECs of the full-length assessed PUFs suggest that those from the pathogenic *M. hyopneumoniae* 7448 strain are potentially more antigenic than their orthologs from the nonpathogenic *M. hyopneumoniae* J strain and *M. flocculare*. These possible differences of antigenicity in PUFs well represented on the bacterial surface may mediate differential interactions with the host immune system. Antigenic variation was also observed in repeating units between the MHP1 and MF1 orthologs. Such differences likely have functional significance, as they may affect not only protein antigenicity/immunogenicity, but also other potential functions, including cell adhesion or transport [10,35,41]. The derived surface proteoforms of MHP1, MF2 and MF3 may also play differential roles in mycoplasma-host interactions. By being exposed on the mycoplasma surface and/or being released in the extracellular milieu, such endoproteolytically-generated proteoforms may directly interact with host molecules. For instance, the swine immune response could be modulated by these antigenic surface proteoforms.



Therefore, future experimental assays will be required to shed light on the functions carried out by these PUFs and their relationship with *M. hyopneumoniae* pathogenicity. Anyhow, as likely immunogenic, these dominant surface PUFs and their derived proteoforms deserve also future characterization as possible vaccine components.

Although MHP1-5 have not been so far functionally characterized by wet-lab experiments, and formally remain as PUFs, MHP1, MHP2 and MHP3 were recently reannotated based on *in silico* predictions as a putative DNA-binding protein, a lipoprotein and a membrane transporter, respectively [20]. DNA-binding proteins may act in the maintenance of chromosome structure, in the regulation of gene expression, or even mediate biofilm formation [27,42]. However, just a few DNA-binding proteins have been so far annotated in the *M. hyopneumoniae* genome [7–9]. Lipoproteins also have been related to pathogenicity and virulence of *Mycoplasma* species, as mediators of complex host-pathogen interactions, from adhesion to cytotoxicity or immunomodulation [36,43,44]. Membrane transporters, in turn, have also been associated with *M. hyopneumoniae* virulence and drug resistance [45,46]. Thus, it will be interesting to functionally characterize MHP1, MHP2 and MHP3, as novel potential, DNA-binding protein, lipoprotein or membrane transporter, respectively. Additionally, MHP1, MHP2 and MHP5 were *in silico* predicted as putative virulence factors [20]. In this context, the functional characterization of these PUFs will also help to investigate their relevance for bacterial virulence.

Finally, phylogenetic analyses were carried out to understand the evolutionary history of the MHP1-5 and ortholog proteins found in other bacteria. The ortholog PUFs identified for MHP1-5 were predominantly found among around 40 *Mycoplasma* species, but only four, namely *M. dispar*, *M. ovipneumoniae*, *M. flocculare* and *Mycoplasma* sp. ‘Moose RK’ presented orthologs for all the assessed *M. hyopneumoniae* PUFs. Interestingly, these four species are all found in the respiratory tract (of cattle, goat, pig or moose, respectively), and it will be interesting to investigate the possible function of proteins from the OGS1-5 for the specific colonization and/or infection of respiratory tissues.

No further putative functional inferences came from the found MHP1-5 orthologs. However, a couple of domains were shared among many of the identified ortholog PUFs, namely LRR and DUF domains. LRR domains have been associated with protein-protein interactions [47]. The identified DUF31 has been associated with peptidase function [48]. No function has been so far associated with the identified DUF2714 domain, but its occurrence is in the Mycoplasmataceae family.

Phylogenetic inferences were not possible for MHP1 and MHP5, likely due to incongruences determined by biological issues involving these sequences, such as horizontal transfer or recombination [49]. However, such inferences were successfully established for MHP2, MHP3 and MHP4 orthologs, describing the evolutive history of these mycoplasma PUFs.

## 5. Conclusions

The five most abundant PUFs on *M. hyopneumoniae* 7448 surface and their orthologs from *M. hyopneumoniae* J and *M. flocculare* were compared and characterized regarding putative functional domains, disordered regions, repeated motifs, and endoproteolytic processing. Differences have been found in at least some of the investigated OGs and derived proteoforms. Such differences were discussed in terms of their association with antigenic and other functional variations, likely correlated to virulence and pathogenicity. Phylogenetic analyses showed that these *M. hyopneumoniae* PUFs and their orthologs are mostly restricted to the Mycoplasmataceae family, and that at least three of them are shared by species that colonize/infect the mammal respiratory tract. Overall, our results pointed out the relevance of these PUFs for *M. hyopneumoniae* pathobiology. Future wet lab experiments will be necessary to address these PUFs and their derived proteoforms regarding protein-protein interactions and immunological properties, with implications for their association with pathogenicity and virulence, and for their potential use as diagnostic or vaccine antigens.

### Author contribution statement

Priscila Souza dos Santos: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Jéssica Andrade Paes: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Lais Del Prá Netto Machado; Gabriela Prado Paludo: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Arnaldo Zaha; Henrique Bunselmeyer Ferreira: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

### Data availability statement

Data included in article/supp. material/referenced in article.

### Additional information

Supplementary content related to this article has been published online at [URL].

### Funding

PSS is a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) Ph.D. fellowship (grant number 88887.353126/2019-00). JAP is a recipient of Programa Nacional de Pós-Doutorado/CAPES (PNPD/CAPES, Brazil) post-doctoral fellowship. LDPNM was a recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) Ph.D.

fellowship (grant number 303287/2017-9). GPP was a recipient of a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) post-doctoral fellowship DTI-1. AZ was a recipient of a CNPq Research Productivity Fellowship (grant number 304551/2017-1). HBF is a recipient of a CNPq Research Productivity Fellowship (grant number 305083/2021-0).

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16141>.  
ND, not detected in surface samples according to Paes et al. [15].

## References

- [1] D. Maes, M. Sibila, P. Kuhnert, J. Segalés, F. Haesebrouck, M. Pieters, Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control, *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (2018) 110–124, <https://doi.org/10.1111/tbed.12677>.
- [2] A.M. Betlach, D. Maes, L. Garza-Moreno, P. Tamiozzo, M. Sibila, F. Haesebrouck, J. Segalés, M. Pieters, *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: current trends and proposed terminology for genomic classification, *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (2019) 1840–1854, <https://doi.org/10.1111/tbed.13233>.
- [3] M. Pieters, D. Maes, *Mycoplasmosis*, in: J.J. Zimmermann, L.A. Kariker, R. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang (Eds.), *Mycoplasmosis*, 11th edn, Wiley, Hoboken, NJ, 2019, pp. 863–883. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch56>.
- [4] G. Saade, C. Deblanc, J. Bougon, C. Marois-Créhan, C. Fablet, G. Auray, C. Belloc, M. Leblanc-Maridor, C.A. Gagnon, J. Zhu, M. Gottschalk, A. Summerfield, G. Simon, N. Bertho, F. Meurens, Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract, *Vet. Res.* 51 (2020) 1–19, <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8>.
- [5] D. Maes, F. Boyen, B. Devriendt, P. Kuhnert, A. Summerfield, F. Haesebrouck, Perspectives for improvement of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in pigs, *Vet. Res.* 52 (2021) 1–20, <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00941-x>.
- [6] Z. Li, Y. Wang, Y. Zhang, X. Tang, X. Wang, W. Liu, Y. Qian, Y. Zhu, H. Chen, C. Tan, Attenuation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain ES-2 and comparative genomic analysis of ES-2 and its attenuated form ES-2L, *Front. Vet. Sci.* 8 (2021) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.696262>.
- [7] F.C. Minion, E.J. Lefkowitz, M.L. Madsen, B.J. Cleary, S.M. Swartzell, G.G. Mahairas, The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 7123–7133, <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7123-7133.2004>.
- [8] F.M. Siqueira, C.E. Thompson, V.G. Virginio, T. Gonchoroski, L. Reolon, L.G. Almeida, M.M. da Fonseca, R. de Souza, F. Prodocimi, I.S. Schrank, H.B. Ferreira, A.T.R. de Vasconcelos, A. Zaha, New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis, *BMC Genom.* 14 (2013) 1–17, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-175>.
- [9] A.T.R. Vasconcelos, H.B. Ferreira, C.V. Bizarro, S.L. Bonatto, M.O. Carvalho, P.M. Pinto, D.F. Almeida, L.G.P. Almeida, R. Almeida, L. Alves-Filho, E. N. Assunção, V.A.C. Azevedo, M.R. Bogo, M.M. Brigido, M. Brocchi, H.A. Burity, A.A. Camargo, S.S. Camargo, D.M. Carraro, J.C. De Mattos Cascardo, L.A. Castro, G. Cavalcanti, G. Chemale, R.G. Collevatti, C.W. Cunha, B. Dallagiovanna, B.P. Dambrós, O.A. Dellagostin, C. Falcão, F. Fantinatti-Garbozzini, M.S.S. Felipe, L. Fiorentin, G.R. Franco, N.S.A. Freitas, D. Frías, T.B. Grangeiro, E.C. Grisard, C.T. Guimarães, M. Hungria, S.N. Jardim, M.A. Krieger, J.P. Laurino, L.F.A. Lima, M.I. Lopes, É.L.S. Loreto, H.M.F. Madeira, G.P. Manfio, A.Q. Maranhão, C.T. Martinkovics, S.R.B. Medeiros, M.A.M. Moreira, M. Neiva, C.E. Ramalho-Neto, M.F. Nicolás, S.C. Oliveira, R.F.C. Paixão, F.O. Pedrosa, S.D.J. Pena, M. Pereira, L. Pereira-Ferrari, I. Piffer, L.S. Pinto, D.P. Potrich, A.C. M. Salim, F.R. Santos, R. Schmitt, M.P.C. Schneider, A. Schrank, I.S. Schrank, A.F. Schuck, H.N. Seuanez, D.W. Silva, R. Silva, S.C. Silva, C.M.A. Soares, K.R. L. Souza, R.C. Souza, C.C. Staats, M.B.R. Steffens, S.M.R. Teixeira, T.P. Urmenyi, M.H. Vainstein, L.W. Zuccherato, A.J.G. Simpson, A. Zaha, Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 5568–5577, <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5568-5577.2005>.
- [10] F.M.A. Leal Zimmer, J.A. Paes, A. Zaha, H.B. Ferreira, Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Virulence* 11 (2020) 1600–1622, <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1842659>.
- [11] S.P. Djordjevic, S.J. Cordwell, A. Michael, J. Wilton, F.C. Minion, M.A. Djordjevic, Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* ciliium adhesion proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* ciliium adhesion, *Infect. Immun.* 72 (2004) 2791–2802, <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2791>.
- [12] P.M. Pinto, G. Chemale, L.A. de Castro, A.P.M. Costa, J.D. Kich, M.H. Vainstein, A. Zaha, H.B. Ferreira, Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins, *Vet. Microbiol.* 121 (2007) 83–93, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.018>.
- [13] P.M. Pinto, C.S. Klein, A. Zaha, H.B. Ferreira, Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Proteome Sci.* 7 (2009) 1–11, <https://doi.org/10.1186/1477-5956-7-45>.
- [14] J.L. Tacchi, B.B.A. Raymond, P.A. Haynes, I.J. Berry, M. Widjaja, D.R. Bogema, L.K. Woolley, C. Jenkins, F.C. Minion, M.P. Padula, S.P. Djordjevic, Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Open Biol.* 6 (2016), <https://doi.org/10.1098/rsob.150210>.
- [15] J. Wilton, C. Jenkins, S.J. Cordwell, L. Falconer, F.C. Minion, D.C. Oneal, M.A. Djordjevic, A. Connolly, I. Barchia, M.J. Walker, S.P. Djordjevic, Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, ciliium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mol. Microbiol.* 71 (2009) 566–582, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06546.x>.
- [16] L.M. Seymour, A.T. Deutscher, C. Jenkins, T.A. Kuit, L. Falconer, F.C. Minion, B. Crossett, M. Padula, N.E. Dixon, S.P. Djordjevic, M.J. Walker, A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 33971–33978, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104463>.
- [17] D.R. Bogema, A.T. Deutscher, L.K. Woolley, L.M. Seymour, B.B.A. Raymond, J.L. Tacchi, M.P. Padula, N.E. Dixon, F.C. Minion, C. Jenkins, M.J. Walker, S.P. Djordjevic, Characterization of cleavage events in the multifunctional ciliium adhesion Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography, *mBio* 3 (2012) 1–11, <https://doi.org/10.1128/mBio.00282-11>.
- [18] A.T. Deutscher, J.L. Tacchi, F.C. Minion, M.P. Padula, B. Crossett, D.R. Bogema, C. Jenkins, T.A. Kuit, M.J. Walker, S.P. Djordjevic, *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 1924–1936, <https://doi.org/10.1021/pr201115v>.
- [19] L.D.P.N. Machado, J.A. Paes, P. Souza dos Santos, H.B. Ferreira, Evidences of differential endoproteolytic processing on the surfaces of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma floccularia*, *Microb. Pathog.* 140 (2020), 103958, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103958>.
- [20] B.A. da R. Tavares, J.A. Paes, A. Zaha, H.B. Ferreira, Reannotation of *Mycoplasma hyopneumoniae* hypothetical proteins revealed novel potential virulence factors, *Microb. Pathog.* 162 (2022), 105344, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105344>.

- [21] J.A. Paes, L.D.P.N. Machado, F.M.D.A. Leal, S.N. De Moraes, H. Moura, J.R. Barr, H.B. Ferreira, Comparative proteomics of two mycoplasma hyopneumoniae strains and mycoplasma flocculare identified potential porcine enzootic pneumonia determinants, *Virulence* 9 (2018) 1230–1246, <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1499379>.
- [22] F.M. dos, A. Leal, V.G. Virginio, C.L. Martello, J.A. Paes, T.J. Borges, N. Jaeger, C. Bonorino, H.B. Ferreira, Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare differential domains from orthologous surface proteins induce distinct cellular immune responses in mice, *Vet. Microbiol.* 190 (2016) 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.008>.
- [23] M. Shahbaaz, K. Bisetty, F. Ahmad, M.I. Hassan, Silico approaches for the identification of virulence candidates amongst hypothetical proteins of Mycoplasma pneumoniae 309, *Comput. Biol. Chem.* 59 (2015) 67–80, <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.09.007>.
- [24] T. Cristina, V. Rodrigues, K. Jaiswal, A. De Sarom, L. De Castro, C. José, F. Oliveira, P. Ghosh, S. Tiwari, F.M. Miranda, L. De, J. Benevides, V. Ariston, D. C. Azevedo, Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Reveal New Therapeutic Targets against Mycoplasma Pneumoniae : a Causative Agent of Pneumonia, 2019.
- [25] D. Ribet, P. Cossart, How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues, *Microb. Infect.* 17 (2015) 173–183, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>.
- [26] P. Li, Y. Zhang, X. Li, W. Zhou, X. Li, F. Jiang, W. Wu, Mycoplasma hyopneumoniae Mhp597 is a cytotoxicity, inflammation and immunosuppression associated nuclease, *Vet. Microbiol.* 235 (2019) 53–62, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.011>.
- [27] B.B.A. Raymond, C. Jenkins, L. Turnbull, C.B. Whitchurch, S.P. Djordjevic, Extracellular DNA release from the genome-reduced pathogen Mycoplasma hyopneumoniae is essential for biofilm formation on abiotic surfaces, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28678-2>.
- [28] T.A. Burnett, K. Dinkla, M. Rohde, G.S. Chhatwal, C. Uphoff, M. Srivastava, S.J. Cordwell, S. Geary, X. Liao, F.C. Minion, M.J. Walker, S.P. Djordjevic, P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells, *Mol. Microbiol.* 60 (2006) 669–686, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05139.x>.
- [29] B.B.A. Raymond, J.L. Tacchi, V.M. Jarocki, F.C. Minion, M.P. Padula, S.P. Djordjevic, P159 from Mycoplasma hyopneumoniae binds porcine cilia and heparin and is cleaved in a manner akin to ectodomain shedding, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 5891–5903, <https://doi.org/10.1021/pr400903s>.
- [30] R. Van Der Lee, M. Buljan, B. Lang, R.J. Weatheritt, G.W. Daughdrill, A.K. Dunker, M. Fuxreiter, J. Gough, J. Gsponer, D.T. Jones, P.M. Kim, R.W. Kriwacki, C. J. Oldfield, R.V. Pappu, P. Tompa, V.N. Uversky, P.E. Wright, M.M. Babu, Classification of intrinsically disordered regions and proteins, *Chem. Rev.* 114 (2014) 6589–6631, <https://doi.org/10.1021/cr400525m>.
- [31] D.R. Bogema, N.E. Scott, M.P. Padula, J.L. Tacchi, B.B.A. Raymond, C. Jenkins, S.J. Cordwell, F.C. Minion, M.J. Walker, S.P. Djordjevic, Sequence TTKF J QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41217–41229, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226084>.
- [32] J.L. Tacchi, B.B.A. Raymond, V.M. Jarocki, I.J. Berry, M.P. Padula, S.P. Djordjevic, Cilium Adhesin P216 (MHJ-0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of mycoplasma hyopneumoniae, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 2920–2930, <https://doi.org/10.1021/pr500087c>.
- [33] M. Widjaja, I.J. Berry, V.M. Jarocki, M.P. Padula, R. Dumke, S.P. Djordjevic, Cell surface processing of the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae identifies novel domains that bind host molecules, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–16, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63136-y>.
- [34] F.C. Minion, C. Adams, T. Hsu, R1 region of P97 mediates adherence of Mycoplasma hyopneumoniae to swine cilia, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3056–3060, <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.3056-3060.2000>.
- [35] L.A. de Castro, T.R. Pedroso, S.S. Kuchiishi, M. Ramenzoni, J.D. Kich, A. Zaha, M.H. Vainstein, H.B. Ferreira, Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in Mycoplasma hyopneumoniae strains, *Vet. Microbiol.* 116 (2006) 258–269, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.022>.
- [36] W. Liu, D. Zhou, F. Yuan, Z. Liu, Z. Duan, K. Yang, R. Guo, M. Li, S. Li, L. Fang, S. Xiao, Y. Tian, Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in Mycoplasma hyopneumoniae, *Microb. Pathog.* 126 (2019) 92–100, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.035>.
- [37] S. Pereyre, P. Sirand-Pugnet, L. Beven, A. Charron, H. Renaudin, A. Barré, P. Avenaud, D. Jacob, A. Couloux, V. Barbe, A. De Daruvar, A. Blanchard, C. Bébear, Life on arginine for Mycoplasma hominis: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas, *PLoS Genet.* 5 (2009), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000677>.
- [38] K. Sachse, J.H. Helbig, I. Lysnyansky, C. Grajetzi, W. Müller, E. Jacobs, D. Yogev, Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of Mycoplasma bovis variable surface lipoproteins, *Infect. Immun.* 68 (2000) 680–687, <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.680-687.2000>.
- [39] I.J. Berry, V.M. Jarocki, J.L. Tacchi, B.B.A. Raymond, M. Widjaja, M.P. Padula, S.P. Djordjevic, N-terminomics identifies widespread endoproteolysis and novel methionine excision in a genome-reduced bacterial pathogen, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–17, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11296-9>.
- [40] L. Moitinho-Silva, M.Y. Kondo, L.C.G. Oliveira, D.N. Okamoto, J.A. Paes, M.F.M. Machado, C.L. Veronez, G. Motta, S.S. Andrade, M.A. Juliano, H.B. Ferreira, L. Juliano, I.E. Gouvea, Mycoplasma hyopneumoniae in vitro peptidase activities: identification and cleavage of kallikrein-kinin system-like substrates, *Vet. Microbiol.* 163 (2013) 264–273, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.011>.
- [41] H.B. Ferreira, L.A. de Castro, A preliminary survey of M. hyopneumoniae virulence factors based on comparative genomic analysis, *Genet. Mol. Biol.* 30 (2007) 245–255, <https://doi.org/10.1590/s1415-47572007000200012>.
- [42] J. Hołówka, J. Zakrzewska-Czerwińska, Nucleoid associated proteins: the small organizers that help to cope with stress, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 1–7, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00590>.
- [43] A. Christodoulides, N. Gupta, V. Yacoubian, N. Maitheh, J. Parker, T. Kelesidis, The role of lipoproteins in mycoplasma-mediated immunomodulation, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01682>.
- [44] F. Bai, B. Ni, M. Liu, Z. Feng, Q. Xiong, G. Shao, Mycoplasma hyopneumoniae-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro, *Vet. Microbiol.* 175 (2015) 58–67, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.013>.
- [45] X. Xia, L. Yang, Y. Ling, J. Yu, H. Ding, Emergence and mechanism of resistance of tulathromycin against mycoplasma hyopneumoniae in a PK/PD model and the fitness costs of 23S rRNA mutants, *Front. Vet. Sci.* 9 (2022) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.801800>.
- [46] M. Galvao Ferrarini, S.G. Mucha, D. Parrot, G. Meiffrein, J.F. Ruggiero Bachega, G. Comte, A. Zaha, M.F. Sagot, Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of Mycoplasma hyopneumoniae, *Mol. Microbiol.* 108 (2018) 683–696, <https://doi.org/10.1111/mmi.13957>.
- [47] P. Enkhbayar, M. Kamiya, M. Osaki, T. Matsumoto, N. Matsushima, Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 54 (2004) 394–403, <https://doi.org/10.1002/prot.10605>.
- [48] N.F. Goodacre, D.L. Gerloff, P. Uetz, Protein domains of unknown function are essential in bacteria, *mBio* 5 (2013) 1–6, <https://doi.org/10.1128/mBio.00744-13>.
- [49] A. Som, Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence, *Briefings Bioinf.* 16 (2014) 536–548, <https://doi.org/10.1093/bib/bbu015>.