UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDA CARVALHO LEAL

**Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI
de *Chromobacterium violaceum***

Ribeirão Preto, SP, Brasil
2020

FERNANDA CARVALHO LEAL

**Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI
de *Chromobacterium violaceum***

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto, SP
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leal, Fernanda Carvalho

Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI de *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2020.

62 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Proteínas VgrGs. 3. Sistemas de secreção. 4. Sistemas de secreção do tipo VI. 5. Competição bacteriana. 6. Genética de bactérias.

Nome: LEAL, Fernanda Carvalho

Título: Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI de *Chromobacterium violaceum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular
Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Aprovada em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI de Chromobacterium violaceum*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Freire da Silva Neto e da aluna Fernanda Carvalho Leal**, tem por objetivo definir a contribuição de cada uma das seis proteínas VgrGs parálogas para o funcionamento do sistema de secreção do tipo VI (T6SS) de *Chromobacterium violaceum*, buscando sobretudo entender seu grau de redundância na capacidade do T6SS de secretar diferentes proteínas efetoras.

Por não satisfazer à condição de estudo experimental envolvendo animais pertencentes ao *filo Chordata* e *subfilo Vertebrado*, conforme diretriz do CONCEA - Lei nº 11.794 de 08/10/2008, declaramos que NÃO COMPETE à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP emitir parecer acerca dos aspectos éticos relacionados a projetos de pesquisa dessa natureza.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2019

Profa. Dra. Katiuchia Uzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, por me acolher em seu laboratório, pelos ensinamentos, sua excelente orientação e por estar sempre presente. Tenho uma imensa admiração e inspiração profissional;

Aos laboratórios da FMRP-USP pelo uso de equipamentos, em especial dos professores Dario Zamboni, Paulo Coelho e Maria Cristina Barreira;

Aos meus amigos do laboratório Bianca, Carlos, Júlia, Juliana Batista, Juliana Diniz, Kelly, Maristela, Raquel, Renato, Vinicius e Waldir pelos momentos compartilhados e troca de conhecimento; Em especial à Júlia por colaborar neste trabalho;

Às técnicas do nosso laboratório Cláudia e Isadora, pelo suporte técnico, e pela ajuda sempre que necessário;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pelo apoio institucional e infraestrutura;

À secretária do nosso Programa de Pós-Graduação Gabriela Bunhotto Zamonier, por estar sempre a nossa disposição para ajudar e esclarecer dúvidas;

À minha família, meus pais Jairo e Sandra, meus irmãos Franco Neto e Jefferson, meus tios Kátia e Cleucio, aos meus primos Eduardo e Giovana, pelo amor incondicional, por me apoiarem e sempre acreditarem em mim;

À minha avó Marta, muito obrigado pelas suas orações, ajudas e conselhos, pois sem a senhora todas estas conquistas seriam muito mais difíceis. Ao meu avô Jairo, que mesmo de longe sempre esteve torcendo por mim. Ao meu avô Sonivaldo e minha avó Neco, que de onde estiverem sei que estão olhando e torcendo por mim.

Ao meu namorado Eduardo por estar sempre me apoiando mesmo que muitas vezes de longe.

Aos meus amigos Raquel, Mariana e Thiago por estarem comigo nos momentos bons e ruins e por sempre me apoiarem.

À todos os meus amigos e amigas de Jataí por mesmo longe se fazerem sempre presentes.

AGRADECIMENTO AO APOIO FINANCEIRO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP (FAEPA), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Leal, FC. Papel de proteínas VgrG parálogas no sistema de secreção do tipo VI de *Chromobacterium violaceum*. 2020. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O sistema de secreção do tipo VI (T6SS) injeta efetores tóxicos dentro das células alvo expelindo um aparato de punção composto por proteínas Hcp, VgrG e PAAR. Ainda não se sabe exatamente como as proteínas efetoras se ligam à VgrG ou o motivo da existência de várias cópias de VgrG em algumas bactérias. Recentemente, nosso grupo mostrou que a bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum* possui um T6SS funcional com atividade antibacteriana. O objetivo do presente trabalho é investigar os genes *vgrGs* do T6SS de *C. violaceum*. As análises *in silico* revelaram que *C. violaceum* possui seis genes *vgrGs* (*vgrG1* a *vgrG6*), com os genes *vgrG1* e *vgrG2* localizados no *cluster* principal do T6SS e os demais quatro genes *vgrGs* localizados em *clusters* órfãos. As seis proteínas VgrGs apresentaram alta identidade de sequência (de 70% a 93%) e a mesma organização de domínios, com todas possuindo um potencial domínio adaptador no C-terminal. Linhagens mutantes foram obtidas com deleção individual de cada gene *vgrG* ou deleção sequencial até obter uma linhagem mutante sêxtupla ($\Delta vgrG1-6$). Cada gene *vgrG* foi introduzido no mutante sêxtuplo. Os ensaios de competição contra bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* utilizando todas estas linhagens mutantes revelaram que a VgrG3 é a mais importante para a atividade antibacteriana do T6SS, pois apenas o mutante individual $\Delta vgrG3$ teve forte redução na capacidade de matar a *P. aeruginosa*; a partir do mutante triplo $\Delta vgrG1-3$ houve perda total da competição mediada pelo T6SS; e apenas *vgrG3* resgatou a capacidade de competição do mutante sêxtuplo. Ensaios de *Western blot* foram utilizados para avaliar a secreção de Hcp nos mutantes *vgrGs* de *C. violaceum* como um indicativo do funcionamento do T6SS. Os dados indicaram que, dos seis mutantes individuais, apenas $\Delta vgrG1$ e $\Delta vgrG3$ tiveram uma diminuição da secreção de Hcp. A partir da deleção tripla $\Delta vgrG1-3$ não houve mais secreção de Hcp. A ausência de secreção no mutante sêxtuplo foi totalmente revertida na presença de *vgrG3* e fracamente recuperada com os outros genes *vgrGs*, indicando maior relevância de VgrG3. Ensaios de β -galactosidase revelaram baixa atividade promotora de *vgrG2* e *vgrG6* e uma

expressão dependente da fase de crescimento nos promotores de *vgrG3* e *vgrG4*. O *vgrG3* foi o gene mais expresso em qualquer condição. Portanto, os dados obtidos neste trabalho indicam pouca redundância entre as seis VgrGs de *C. violaceum*, uma vez que a VgrG3 possui papel preponderante em relação às outras cinco VgrGs na montagem de um T6SS funcional com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Sistemas de secreção bacterianos, sistema de secreção do tipo VI, proteínas VgrGs parálogas, competição bacteriana, *Chromobacterium violaceum*, proteínas efetoras.

ABSTRACT

Leal, FC. Role of paralogous VgrG proteins in the *Chromobacterium violaceum* type VI secretion system. 2020. 62 p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

The type VI secretion system (T6SS) delivers toxic effectors inside target cells by expelling a puncturing apparatus composed of Hcp, VgrG, and PAAR proteins. It is not yet known precisely how the effector proteins bind to VgrG or the reason for the existence of multiple copies of VgrG in some bacteria. Recently, our group has shown that the Gram-negative bacterium *Chromobacterium violaceum* has a functional T6SS with antibacterial activity. In this work, we aim to investigate the *vgrG* genes of the *C. violaceum* T6SS. *In silico* analysis revealed that *C. violaceum* has six *vgrG* genes (*vgrG1* to *vgrG6*), with the *vgrG1* and *vgrG2* genes located in the main T6SS cluster and the other four *vgrG* genes found in orphan clusters. The six VgrG proteins showed high sequence identity (from 70% to 93%) and the same organization of domains, with all of them having a potential adapter domain at the C-terminal. Mutant strains were obtained with individual deletion of each *vgrG* gene or sequential deletion until a sextuple mutant strain was obtained ($\Delta vgrG1-6$). Each *vgrG* gene was introduced into the sextuple mutant. Competition tests against bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, using all these mutant strains, revealed that VgrG3 is the most important for the T6SS antibacterial activity, since only the individual mutant $\Delta vgrG3$ had a strong reduction in the ability to kill *P. aeruginosa*; from the triple mutant $\Delta vgrG1-3$, there was total loss of competition mediated by T6SS; and only the *vgrG3* rescued the competition ability of the sextuple mutant. Western blot assays were used to evaluate Hcp secretion in the *C. violaceum vgrG* mutants as an indicator of T6SS activity. The data indicated that, of the six individual mutants, only $\Delta vgrG1$ and $\Delta vgrG3$ had a decrease in Hcp secretion. From the $\Delta vgrG1-3$ triple deletion, there was no more Hcp secretion. The absence of secretion in the sextuple mutant was completely reversed in the presence of *vgrG3* and poorly recovered with the other *vgrGs* genes, indicating greater relevance of VgrG3. B-galactosidase assays revealed low promoter activity of *vgrG2* and *vgrG6* and an expression dependent on the growth phase in the promoters of *vgrG3* and *vgrG4*. *vgrG3* was the most expressed gene in any condition. Therefore, the data obtained in this work indicate little redundancy

among the six VgrGs of *C. violaceum*, since VgrG3 has a preponderant role in relation to the other five VgrGs in the assembly of a functional T6SS with antibacterial activity.

Keywords: Bacterial secretion systems, type VI secretion system, VgrG paralogs, bacterial competition, *Chromobacterium violaceum*, effector proteins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos.....	28
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistemas de secreção de proteínas em bactérias Gram-negativas.....	18
Figura 2: Componentes essenciais e funcionamento do T6SS.....	22
Figura 3: Efetores cargo e efetores especializados secretados pelo T6SS.....	24
Figura 4: Estratégia utilizada para obtenção das linhagens mutantes nulas.....	34
Figura 5: Esquema do ensaio de competição bacteriano.....	36
Figura 6: <i>Clusters</i> gênicos contendo os genes <i>vgrGs</i> do T6SS de <i>C. violaceum</i>	38
Figura 7: Análise <i>in silico</i> das proteínas VgrGs de <i>C. violaceum</i>	39
Figura 8: Confirmação das linhagens mutantes dos genes <i>vgrGs</i>	40
Figura 9: Curvas de crescimento das linhagens mutantes <i>vgrGs</i>	41
Figura 10: Ensaio de competição interbacteriana qualitativo dos mutantes <i>vgrGs</i>	43
Figura 11: Ensaio de competição quantitativo dos mutantes <i>vgrGs</i> contra <i>P. aeruginosa</i>	44
Figura 12: Análise da secreção de Hcp em mutantes <i>vgrGs</i> por <i>Western blot</i>	45
Figura 13: Complementação de mutantes <i>vgrGs</i> de <i>C. violaceum</i>	46
Figura 14: Alinhamento múltiplo das regiões promotoras dos genes <i>vgrGs</i> órfãos.....	48
Figura 15: Ensaio da atividade de β -galactosidase de promotores de genes <i>vgrGs</i>	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Mecanismos de competição bacteriana	16
1.2 Sistemas de secreção de proteínas em bactérias	17
1.3 Sistemas de secreção do tipo VI	20
1.4 Papel das proteínas VgrGs no T6SS	22
1.5 Aspectos gerais de <i>Chromobacterium violaceum</i>	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos	28
3.2 Meios de cultura e condições de cultivo	29
3.3 Análises <i>in silico</i>	30
3.4 Técnicas de clonagem e biologia molecular	30
3.4.1 Reações de PCR	30
3.4.2 Digestão do DNA com enzimas de restrição	30
3.4.3 Ligação, transformação e minipreparação de DNA	31
3.4.4 Sequenciamento de DNA	31
3.5 Construção das linhagens mutantes	33
3.6 Construção das linhagens complementadas	33
3.7 Curvas de crescimento	34
3.8 Ensaio de competição bacteriana	35
3.8.1 Ensaio de competição bacteriana qualitativo	35
3.8.2 Ensaio de competição bacteriana quantitativo	35
3.9 Ensaio de <i>Western blot</i>	36
3.10 Análise da atividade de β -galactosidase	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Análise <i>in silico</i> das proteínas VgrGs do T6SS de <i>C. violaceum</i>	38
4.2 Construção das linhagens mutantes e complementadas das VgrGs de <i>C. violaceum</i>	39
4.3 Perfil de crescimento das linhagens mutantes <i>vgrGs</i>	41
4.4 Papel das VgrGs de <i>C. violaceum</i> na competição interbacteriana	42
4.5 Análise do papel das VgrGs no funcionamento do T6SS de <i>C. violaceum</i>	44
4.6 Complementação dos mutantes <i>vgrGs</i> de <i>C. violaceum</i>	46
4.7 Análise da região promotora e da expressão dos genes <i>vgrGs</i>	47

5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mecanismos de competição bacteriana

Os microrganismos vivem em ambientes complexos e diversos, nos quais ocorrem diferentes formas de interação com outros organismos, como as interações cooperativas e competitivas. As interações cooperativas são vantajosas, uma vez que diminuem os custos aos parceiros que interagem (ASFAHL e SCHUSTER, 2017). Porém, a maioria das interações que ocorrem na natureza são competitivas. A competição entre as bactérias pode ocorrer de dois modos: exploratório ou por interferência (GHOUL e MITRI, 2016; STUBBENDIECK e STRAIGHT, 2016; GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018). O tipo exploratório ocorre quando um organismo impede o acesso de outro aos nutrientes, esgotando o meio destes recursos, como ocorre, por exemplo, entre bactérias da microbiota intestinal e bactérias patogênicas entéricas competindo por nutrientes. Já a competição por interferência ou direta ocorre através da produção de fatores antagônicos como toxinas que prejudicam a sobrevivência de outras bactérias (CHASSAING e CASCALES, 2018; GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018; RAFFATELLU, 2018).

A competição pode ocorrer à distância ou mediada por contato. A competição à distância ocorre através da produção de fatores secretados difusíveis, como metabólitos secundários, bacteriocinas e enzimas hidrolíticas, que vão prejudicar o crescimento de competidores (STUBBENDIECK e STRAIGHT, 2016). Essa competição pode ocorrer tanto de forma exploratória, como por exemplo, através da produção de metabólitos especializados chamados sideróforos, que quelam o ferro, levando a escassez desse micronutriente, ou por interferência, onde moléculas secretadas como antibióticos e bacteriocinas podem inibir diretamente o crescimento dos concorrentes (RAFFATELLU, 2018). No caso de enzimas hidrolíticas, estas podem degradar moléculas sinalizadoras, prejudicando a comunicação de outras bactérias, ou proporcionar resistência a antibióticos, levando a um benefício na competição. Outra forma de competição à distância é através da liberação de vesículas extracelulares, nanopartículas lipídicas que permitem a entrega de diversas moléculas importantes para a competição (GHOUL e MITRI, 2016; STUBBENDIECK e STRAIGHT, 2016).

A competição mediada por contato envolve interação física direta entre as bactérias competidoras e pode ocorrer por pelo menos três mecanismos já bem documentados (GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018). O primeiro deles, restrito a

Myxococcus xanthus, envolve a fusão de membrana externa de bactérias mediada por receptores TraAB, onde as células aparentadas compartilham componentes da membrana externa e entregam componentes tóxicos insolúveis à bactérias não-relacionadas (STUBBENDIECK e STRAIGHT, 2016). Outra forma é a inibição dependente de contato (CDI, *Contact-Dependent Inhibition*), que consiste em três proteínas CdiBAI, em que a CdiA é uma proteína filamentosa ligada a uma proteína transportadora de membrana externa, a CdiB (sistema de secreção do tipo V), enquanto a CdiI é a proteína de imunidade que protege a célula produtora desse sistema e as irmãs de uma possível intoxicação. Quando duas células fazem contato, a célula produtora de CDI faz contato direto com receptor na membrana externa da célula-alvo e a proteína CdiA sofre auto-clivagem liberando sua parte C-terminal citotóxica na célula-alvo (CHASSAING e CASCALES, 2018). Por fim, a terceira forma de inibição dependente de contato descrita até o momento e uma das mais comuns entre bactérias é a injeção de efetores tóxicos proteicos diretamente na célula-alvo bacteriana, mais comumente utilizando o sistema de secreção do tipo VI, ou por meio do sistema de secreção do tipo IV (CHASSAING e CASCALES, 2018; GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018).

1.2. Sistemas de secreção de proteínas em bactérias

As bactérias possuem várias estratégias para se comunicarem e responderem ao ambiente. Uma dessas estratégias é a secreção de proteínas para fora de suas células por aparatos multiproteicos, chamados de sistemas de secreção, os quais são capazes de selecionar especificamente suas cargas e movê-las através de membranas (COSTA et al., 2015; GALÁN e WAKSMAN, 2018). Alguns destes sistemas são encontrados em quase todas as bactérias e secretam uma grande variedade de substratos, associados frequentemente com aquisição de nutrientes e virulência, enquanto outros foram identificados em apenas um pequeno número de espécies bacterianas ou são dedicados a secretar apenas uma ou algumas proteínas (COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016). Dependendo do sistema, os substratos secretados têm três destinos possíveis: eles permanecem associados com a membrana externa, eles são liberados no espaço extracelular, ou eles são injetados em uma célula-alvo, seja eucariótica ou bacteriana (COSTA et al., 2015). Nas bactérias Gram-negativas, estas maquinarias podem ser divididas em duas categorias: as que abrangem tanto a membrana interna (IM) quanto a membrana externa (OM), e aquelas que abrangem apenas a OM (COSTA et al., 2015).

Os sistemas de secreção em bactérias Gram-negativas são numerados tipo I ao VI, com cada sistema transportando um subconjunto específico de proteínas (Figura 1). Embora exibam grandes diferenças em suas estruturas e funções, quase todos estes são dependentes de canais β -barril que formam um anel na membrana externa da célula bacteriana (BADR et al., 2016; GREEN e MECSAS, 2016). Esses sistemas podem secretar proteínas em uma etapa, através da membrana interna e externa, tal como os sistemas de secreção do tipo I (T1SS), tipo III (T3SS), tipo IV (T4SS) e tipo VI (T6SS), ou em duas etapas, quando as proteínas são primeiramente translocadas no espaço periplasmático através dos sistemas Sec ou Tat, e posteriormente secretadas através da membrana externa, como no caso dos sistemas de secreção do tipo II (T2SS) e tipo V (T5SS) (Figura 1) (COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016; GALÁN e WAKSMAN, 2018). Recentemente um novo sistema de secreção foi descoberto em micobactérias e bactérias Gram-positivas, o sistema de secreção do tipo VI (T7SS) ou sistema ESX, como foi primeiramente denominado em *Mycobacterium tuberculosis*. Enquanto em *M. tuberculosis* sistemas ESXs, como ESX-1 e ESX-3, secretam efetores com papel em virulência, em bactérias Gram-positivas o T7SS tem sido descrito como importante para secreção de efetores tóxicos antibacterianos (GREEN e MECSAS, 2016; UNNIKRISHNAN et al., 2017; GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018).

Figura 1: Sistemas de secreção de proteínas em bactérias Gram-negativas. Os seis sistemas de secreção podem ser divididos em dois grupos: os que secretam proteínas em uma etapa através do envelope celular, ou em duas etapas, quando primeiramente as proteínas são translocadas para o espaço periplasmático pelos sistemas Sec ou Tat, para posteriormente serem secretadas através da membrana externa. Retirado de GREEN e MECSAS, 2016.

Geralmente mais de um T1SS é encontrado por bactéria. Em patógenos, os substratos de T1SS podem ser toxinas ou adesinas (DELEPELAIRE, 2004). A maquinaria do T1SS é das mais simples dentre os sistemas de secreção, consistindo de uma proteína de membrana externa, como a TolC, uma proteína adaptadora periplasmática (proteína de fusão de membrana), e um transportador do tipo ABC associado à membrana interna (COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016). Conservado em diversas bactérias Gram-negativas, o T2SS transporta proteínas do periplasma para o meio extracelular, após estas terem sido transferidas através da membrana interna pelas vias Sec ou Tat. Em bactérias o T2SS é utilizado para secreção de múltiplos substratos proteicos, sendo estes geralmente enzimas hidrolíticas ou toxinas. Os T2SSs são maquinarias complexas, formadas por até 15 proteínas, as quais estão organizadas em quatro subcomplexos associados ao envelope celular (COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016).

O T3SS é um dos mais estudados por desempenhar papel fundamental na patogênese de várias bactérias. Além do aparato no envelope este complexo sistema possui uma estrutura semelhante a uma “agulha” que injeta proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células-alvo do hospedeiro em um único passo (GREEN e MECSAS, 2016; GALÁN e WAKSMAN, 2018). Semelhantemente, o T4SS também é capaz de transferir substratos diretamente para o citoplasma da célula-alvo. Entretanto, os substratos secretados podem ser complexos DNA-proteína (conjugação) ou proteínas com ação em células eucarióticas ou bacterianas (SOUZA et al., 2015). Apesar da diversidade em seus substratos e funções, os T4SSs compartilham componentes comuns e operam de forma semelhante (WALLDEN et al., 2010; GALÁN e WAKSMAN, 2018).

O T5SS pode ser do tipo autotransportador ou de dois pares. No primeiro caso, a proteína que é a carga a ser secretada possui um domínio que forma o poro na membrana externa para sua própria secreção. No sistema de dois pares, como o sistema CDI formado por CdiA e CdiB, o substrato secretado (CdiA) depende de outra proteína (CdiB). Os T5SSs secretam fatores de virulência e também participam de adesão célula-a-célula, formação de biofilme e competição dependente de contato (COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016). O sistema de secreção do tipo VI (T6SS), definido funcionalmente em 2006 em *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi o último a ser descrito em bactérias Gram-negativas e desde então vem sendo estudado em várias bactérias (HO et al., 2014; COSTA et al., 2015; GREEN e MECSAS, 2016).

1.3. Sistemas de secreção do tipo VI

O sistema de secreção do tipo VI (T6SS) é um dos sistemas descobertos mais recentemente, tendo sido definido como tal através da identificação genética de vários dos seus componentes essenciais em dois artigos fundamentais em 2006, usando como modelo *V. cholerae* e *P. aeruginosa* (MOUGOUS et al., 2006; PUKATZKI et al., 2006). Embora estas duas bactérias continuem sendo os dois modelos mais importantes e com mais avanços nos estudos com T6SS (BASLER, 2015; CHEN et al., 2016), este sistema tem sido muito estudado em várias outras bactérias (CIANFANELLI et al., 2016a) e estudos em bioinformática identificaram que os genes codificadores desta maquinaria estão amplamente distribuídos nas bactérias Gram-negativas, sobretudo nos subgrupos α , β - e γ -proteobactérias (BOYER et al., 2009). Inicialmente associada à entrega de efetores anti-eucarióticos em células de hospedeiros (HACHANI et al., 2016; PUKATZKI et al., 2007), esta maquinaria tem se mostrado cada vez mais fundamental também como um elaborado sistema para eliminação de bactérias competidoras via secreção direta de efetores antibacterianos tóxicos (KAPITEIN e MOGK, 2013; ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; ALTERI e MOBLEY, 2016).

Em termos de organização genômica, os componentes do T6SS são codificados por genes encontrados agrupados em grandes *clusters* no cromossomo (de 15 a 38 genes de acordo com a bactéria), sendo a expressão desses *clusters* regulada nos níveis de transcrição, pós-transcrição e/ou pós-tradução (HO et al., 2014; ALLSOPP et al., 2017). Os chamados componentes centrais, um conjunto mínimo de 14 genes conservados necessários para a montagem de um T6SS funcional, são todos localizados neste *cluster* principal, enquanto outros *clusters* menores apresentam geralmente cópias extras de alguns genes da maquinaria principal (*hcp*, *vgrG*), associados a genes que codificam proteínas efetoras ou proteínas de imunidade (ZHENG e LEUNG, 2007; BOYER et al., 2009; ZOUED et al., 2014; CIANFANELLI et al., 2016b). Comumente, as bactérias possuem genes para a montagem de um único T6SS, embora em alguns casos como em *P. aeruginosa*, possa existir mais de um T6SS, já que esta bactéria tem três T6SS (H1-T6SS, H2-T6SS e H3-T6SS) codificados em três *clusters* separados (CHEN et al., 2016; CIANFANELLI et al., 2016a; ALLSOPP et al., 2017).

Uma série de estudos cristalográficos e de interação proteína-proteína indica que os 14 componentes essenciais para montagem de um T6SS associam-se em subcomplexos distintos montados de modo sequencial (Figura 2): (i) um complexo de ancoragem no

envelope é formado (proteínas TssJ e TssL na IM e TssM na OM), ao qual se associa pela parte citoplasmática (ii) um subcomplexo de placa basal (possivelmente as proteínas TssA, TssE, TssF, TssG e TssK), a partir do qual será montado (iii) o aparato de perfuração formado por trímeros da proteína VgrG (*valine-glycine repeat* G), nos quais associam-se proteínas PAAR e os efetores. Os trímeros de VgrG funcionam então como um centro de nucleação para polimerização (iv) do tubo interno composto por anéis hexaméricos da proteína Hcp (*haemolysin coregulated protein*), em volta do qual é polimerizada (v) a bainha que envolve o tubo, formada por TssB e TssC (também chamadas VipA e VipB) (Figura 2) (ZOUED et al., 2014; BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a).

Diversos estudos envolvendo técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de alta resolução e microscopia de fluorescência *time-lapse* com a proteína da bainha VipA fusionada a GFP revelaram que a dinâmica de funcionamento do T6SS assemelha-se ao funcionamento da cauda contrátil de bacteriófagos (BASLER et al., 2012; CIANFANELLI et al., 2016a), o que é consistente com a similaridade observada entre várias proteínas destas duas maquinarias (HO et al., 2014). As análises de MET e de microscopia de fluorescência revelaram que uma estrutura tubular era montada no citosol e visualizada em duas conformações, uma maior e uma menor (BASLER et al., 2012). Essas conformações são consistentes com o modelo proposto de que a estrutura tubular é montada em uma forma estendida no citoplasma e por contração da bainha TssBC o tubo interno Hcp contendo na ponta o aparato perfurante VgrG/PAAR com os efetores é lançado na célula alvo (Figura 2). O modelo propõe ainda que a ATPase ClpV atua na desmontagem das subunidades da bainha contraída, reciclando os monômeros de TssB e TssC para formação de novas bainhas e novos ciclos de disparo (BASLER et al., 2012; ZOUED et al., 2014; BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a). Assim, a visão atual é a de que o T6SS é uma versátil nanomáquina contrátil utilizada para translocar proteínas efetoras tóxicas diretamente para dentro de uma célula alvo adjacente de modo dependente de contato (CIANFANELLI et al., 2016a; GALÁN e WAKSMAN, 2018).

Figura 2: Componentes essenciais e funcionamento do T6SS. Os trímeros das proteínas VgrGs funcionam como um centro de nucleação para a polimerização do tubo interno de Hcp. A contração rápida da bainha de VipAB (TssBC) conduz a estrutura Hcp-VgrG-PAAR para fora da célula secretora. Após a contração, os efetores são liberados dentro da célula-alvo e a bainha é despolimerizada por uma ATPase específica chamada ClpV. Retirado de CIANFANELLI et al., 2016a.

1.4. Papel das proteínas VgrGs no T6SS

Um dos primeiros indícios de qual seria o papel das proteínas VgrGs no T6SS foi a observação de que VgrGs possuem similaridade de sequência e estrutural com as proteínas gp5 e gp27 que formam o complexo gp27-gp5, o aparato perfurante trimérico, também chamado *needle* ou *spike*, que alguns bacteriófagos como o T4 utilizam para furar membranas de bactérias. No T6SS, gp27 e gp5 encontram-se como dois domínios fusionados de uma proteína VgrG única que também forma trímeros (HO et al., 2014). Ao trímero de VgrG associa-se um componente adicional chamado PAAR (*proline-alanine-alanine-arginine repeat*) que monta uma estrutura cônica, afiando a sua ponta, além de ajudar a dobrar e estabilizar o domínio β -hélice de VgrG, formando assim o aparato perfurante trimérico VgrG/PAAR do T6SS (Figura 2), similar ao aparato *spike*

do fago T4 (SHNEIDER et al., 2013; BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a). Há indícios de que a proteína PAAR seja essencial para funcionalidade do T6SS através da nucleação das proteínas VgrGs ou regulando sua inclusão no T6SS (SHNEIDER et al., 2013; HACHANI et al., 2014; WOOD et al., 2019).

Embora muitas VgrGs, chamadas de canônicas, sejam formadas apenas pela estrutura cerne com os domínios gp27-gp5, tem sido descritos vários domínios efetores adicionais com atividade enzimática fusionados ao C-terminal de VgrGs, sendo estas chamadas de VgrGs especializadas ou “evoluídas” (ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; HACHANI et al., 2016). Um exemplo de VgrG especializada é a VgrG1 de *V. cholerae*, que possui um domínio C-terminal ACD (*actin cross-linking domain*), o qual catalisa a ligação cruzada de monômeros de G-actina da célula hospedeira (PUKATZKI et al., 2007). Outro domínio C-terminal encontrado associado a várias proteínas VgrG, o domínio de função desconhecida DUF2345, foi recentemente descrito como um domínio adaptador importante para interação de VgrG com efetores (FLAUGNATTI et al., 2016). Estudos também indicam que VgrG funciona como uma plataforma de nucleação para a montagem adequada do tubo Hcp do T6SS, sendo assim definida como um componente essencial da maquinaria (BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a). Portanto, a natureza modular de VgrGs permite a estas proteínas desempenharem várias funções, como interagir com o tubo Hcp, formar o aparato perfurante com PAAR, funcionar como sítio de associação com efetores, ou ainda ser o próprio efector, no caso de VgrGs especializadas (BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a; HACHANI et al., 2016).

Um aspecto importante que tem ganhado muita atenção nos estudos atuais com o T6SS é o entendimento de como as proteínas efectoras são reconhecidas e secretadas e a ação destes efetores nas células-alvo (Figura 3). Com relação aos chamados efetores especializados, ou seja, aqueles que o domínio efector encontra-se fusionado covalentemente com um dos componentes do aparato perfurante do T6SS (região C-terminal de VgrG, PAAR e talvez Hcp) a translocação é intrínseca ao evento de disparo da bainha, já que este aparato é injetado na célula-alvo (BASLER, 2015; CIANFANELLI et al., 2016a; HACHANI et al., 2016; COULTHURST, 2019). Já para uma outra classe abundante de efetores, chamados de efetores cargo, os modelos atuais de transporte propõem que estes efetores se liguem às proteínas Hcp, VgrG ou PAAR diretamente ou através de proteínas adaptadoras ou chaperonas (Figura 3) (SHNEIDER et al., 2013; DURAND et al., 2014; ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; CIANFANELLI et al., 2016b). Esta interação ocorre principalmente com VgrGs e foi sugerido que as

combinações VgrG/efetores não são intercambiáveis, pois a seleção dos efetores depende de motivos de interação específicos nas VgrGs. Recentemente, as proteínas adaptadoras da família DUF4123 foram definidas como importantes para interação de efetores cargo com VgrGs e foram caracterizadas como necessárias para translocação de um grande número de efetores do T6SS (LIANG et al., 2015; UNTERWEGER et al., 2015).

Figura 3: Efetores cargo e efetores especializados secretados pelo T6SS. Os efetores especializados são domínios covalentemente fusionados de componentes do aparato perfurante (Hcp, PAAR e VgrG), enquanto os efetores cargo interagem não-covalentemente com estes componentes por meio de proteínas adaptadoras. Retirado de COULTHURST, 2019.

Com relação à atividade bioquímica dos efetores, a maioria dos que são antibacterianos atuam como enzimas tóxicas que degradam moléculas celulares essenciais como peptidoglicano, lipídeos ou ácidos nucleicos, o que resulta na morte da bactéria que está sendo atacada, a não ser que esta possua genes que codificam proteínas de imunidade cognatas, capazes de neutralizar o efector (RUSSELL et al., 2012; RUSSELL et al., 2013; MA et al., 2014; ALCOFORADO DINIZ et al., 2015). Geralmente a proteína de imunidade reside no local em que a toxina será entregue, e a inibição se dá através de uma ligação de alta afinidade que pode ocorrer de duas formas: através da obstrução do sítio catalítico ou dificultando o acesso ao alvo (FLAUGNATTI et al., 2016). Os T6SSs também podem entregar efetores que atuem no citoplasma

bacteriano. Várias nucleases secretadas pelo T6SS já foram descritas, além de alguns PAAR especializados que possuem atividade de RNase e DNase (COULTHURST, 2019). No caso dos efetores anti-eucarióticos, em muitos casos os efetores são proteínas que alteram alguma função da célula hospedeira em benefício da bactéria (ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; HACHANI et al., 2016).

1.5. Aspectos gerais de *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é classificada no grupo das β -proteobactérias e na família Neisseriaceae. Esta bactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita e anaeróbia facultativa foi descrita pela primeira vez no final do século XIX por Bergonzini e Boisbaudran (BERGONZINI, 1881; BOISBAUDRAN, 1882), e apenas recentemente novas espécies foram descritas no gênero *Chromobacterium* (BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). As cromobactérias habitam o solo e a água em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo encontradas, por exemplo, na água e nas bordas do Rio Negro, na Amazônia (DURÁN e MENCK, 2001; DURÁN et al., 2010). Alguns dos mecanismos que podem estar relacionados com a notável capacidade de adaptação destas bactérias às condições adversas ambientais foram revelados com o sequenciamento completo do genoma da linhagem ATCC 12472 (VASCONCELOS et al., 2003; HUNGRIA et al., 2004) e com o sequenciamento em versão *draft* de várias outras linhagens e espécies de *Chromobacterium* (BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Vários dos estudos com *C. violaceum* exploram a produção por esta bactéria do pigmento roxo chamado violaceína, o qual confere coloração característica de suas colônias, seja porque este composto tem potencial propriedades terapêuticas devido sua ação tóxica em diversos tipos celulares, ou porque sua síntese é regulada por *quorum sensing* (QS) (DEMOSS e EVANS, 1959; DE SOUZA et al., 1999; DURÁN et al., 2016). O sistema de QS de *C. violaceum* é do tipo LuxIR, sendo constituído por uma molécula autoindutora de N-acilhomoserina lactona (AHL), sintetizada por CviI, e um receptor CviR, que quando em complexo com AHL ativa em alta densidade celular promotores de genes que codificam quitinases, exoproteases e a síntese de violaceína (DURÁN et al., 2016; STAUFF e BASSLER, 2011). Diversos isolados de *C. violaceum* são responsáveis pela produção de uma gama de outros metabólitos secundários com potencial biotecnológico, tais como antibióticos, polímeros biodegradáveis, depsipeptídeo

antitumoral, quitinases antifúngicas e cianeto, muitos deles regulados por QS (DURÁN e MENCK, 2001; DURÁN et al., 2016; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Embora seu habitat natural seja água e solo, *C. violaceum* pode atuar como um patógeno oportunista em alguns animais e no homem, causando septicemia fatal a partir de lesões na pele expostas a solo ou água contaminada, produzindo abscessos no fígado, pâncreas e pulmão (DURÁN e MENCK, 2001; YANG e LI, 2011). Os primeiros registros de infecção por *C. violaceum* foram feitos em búfalos nas Filipinas e em humanos na Malásia (SNEATH, 1953). Desde então, quase duas centenas de casos tem sido relatados na literatura médica em diversos países (YANG e LI, 2011), incluindo alguns poucos casos fatais no Brasil (MARTINEZ et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2005). Um dos motivos para sua elevada letalidade seria a alta resistência intrínseca desta bactéria a antibióticos (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017).

Como já sugerido pelo sequenciamento e análise da sequência do genoma da linhagem ATCC 12472 da *C. violaceum* (VASCONCELOS et al., 2003), a presença do T3SS mostrou-se essencial para a virulência desta bactéria (MIKI et al., 2010), seja por secretar efetores em células eucarióticas (MIKI et al., 2011) ou por funcionar como agonista capaz de ativar células do sistema imune inato necessárias para controlar a infecção por *C. violaceum* (MALTEZ et al., 2015). Embora o genoma de *C. violaceum* potencialmente codifica também T1SS, T2SS, T5SS e T6SS (VASCONCELOS et al., 2003), para todos estes outros sistemas de secreção ainda não há trabalhos publicados nesta bactéria. Dados recentes de outro trabalho em andamento do nosso laboratório indicam que o T6SS é funcional e importante para *C. violaceum* competir com outras bactérias, mas o papel das múltiplas cópias de VgrG encontradas no genoma de *C. violaceum* e o grau de redundância e/ou especificidade destas proteínas para o funcionamento do T6SS ainda não foram explorados e são, portanto, os alvos dos esforços deste trabalho.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi definir a contribuição de cada uma das seis proteínas VgrGs parálogas para o funcionamento do sistema de secreção do tipo VI (T6SS) de *Chromobacterium violaceum*, buscando sobretudo entender seu grau de redundância na capacidade do T6SS de secretar proteínas efetoras antibacterianas.

Para atingir tal finalidade foram utilizadas as seguintes estratégias:

- (i) Obter linhagens mutantes com deleção de cada um dos seis genes *vgrGs* individuais e mutantes com deleção sequencial destes genes até obtenção de mutante sêxtuplo sem nenhuma VgrG;
- (ii) Reintroduzir no mutante sêxtuplo cada VgrG individual para analisar a redundância destas proteínas;
- (iii) Realizar ensaios de competição bacteriana usando a linhagem selvagem e os múltiplos mutantes *vgrGs* para avaliar se a deleção das VgrGs afeta a secreção de efetores tóxicos;
- (iv) Realizar ensaios de detecção de Hcp no sobrenadante de culturas dos múltiplos mutantes *vgrGs* para avaliar quantas e quais VgrGs são necessárias para montagem e funcionamento do T6SS;
- (v) Analisar o perfil de expressão transcricional dos múltiplos genes *vgrGs*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas e plasmídeos

As linhagens bacterianas de *Escherichia coli* e *Chromobacterium violaceum* e os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos

Linhagens	Genótipo/Finalidade	Origem/Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	HANAHAN, 1983
S17-1	Conjugação de plasmídeos	SIMON et al., 1983
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
ATCC 12472	Linhagem selvagem. Sequenciada, isolado de água, patogênica, produz violaceína	Fundação André Tosello (Campinas)
Δ <i>hcp</i> (CV_3977)	Mutante nulo para o gene CV_3977	Doutorado Júlia A. Alves
Δ <i>vipA</i> (CV_3979)	Mutante nulo para o gene CV_3979	Doutorado Júlia A. Alves
Δ <i>vgrG1</i> (CV_3986)	Mutante nulo para o gene CV_3986	Este trabalho
Δ <i>vgrG2</i> (CV_3975)	Mutante nulo para o gene CV_3975	Este trabalho
Δ <i>vgrG3</i> (CV_1432)	Mutante nulo para o gene CV_1432	Este trabalho
Δ <i>vgrG4</i> (CV_1233)	Mutante nulo para o gene CV_1233	Este trabalho
Δ <i>vgrG5</i> (CV_0023)	Mutante nulo para o gene CV_0023	Este trabalho
Δ <i>vgrG6</i> (CV_0016)	Mutante nulo para o gene CV_0016	Este trabalho
Δ <i>vgrG1-2</i> (CV_3986/3975)	Mutante nulo para os genes CV_3986 e CV_3975	Este trabalho
Δ <i>vgrG1-3</i> (CV_3986/3975/1432)	Mutante nulo para os genes CV_3986, CV_3975 e CV_1432	Este trabalho
Δ <i>vgrG1-4</i> (CV_3986/3975/1432/1233)	Mutante nulo para os genes CV_3986, CV_3975, CV_1432 e CV_1233	Este trabalho
Δ <i>vgrG1-5</i> (CV_3986/3975/1432/1233/0023)	Mutante nulo para os genes CV_3986, CV_3975, CV_1432, CV_1233 e CV_0023	Este trabalho
Δ <i>vgrG1-6</i> (CV_3986/3975/1432/1233/0023/0016)	Mutante nulo para os genes CV_3986, CV_3975, CV_1432, CV_1233, CV_0023 e CV_0016	Este trabalho
WT [pMR20]	<i>C. violaceum</i> selvagem com o vetor pMR20 vazio	Este trabalho
WT [pSEVA]	<i>C. violaceum</i> selvagem com o vetor pSEVA vazio	Este trabalho

$\Delta vgrG3$ [pSEVA]	Mutante nulo para o gene CV_1432 com o vetor pSEVA vazio	Este trabalho
$\Delta vgrG3$ [pSEVA $vgrG3$]	Mutante nulo para o gene CV_1432 complementado com o gene CV_1432 no vetor pSEVA	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pSEVA]	Mutante sem <i>vgrGs</i> com o vetor pSEVA vazio	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pMR20 $vgrG1$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_3986 no vetor pMR20	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pMR20 $vgrG2$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_3975 no vetor pMR20	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pSEVA $vgrG3$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_1432 no vetor pSEVA	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pMR20 $vgrG4$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_1233 no vetor pMR20	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pMR20 $vgrG5$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_0023 no vetor pMR20	Este trabalho
$\Delta vgrG1-6$ [pMR20 $vgrG6$]	Mutante sem <i>vgrGs</i> complementado com o gene CV_0016 no vetor pMR20	Este trabalho
WT [<i>lacZ</i> -pv $vgrG2$]	Linhagem <i>C. violaceum</i> selvagem contendo a região promotora do gene CV_3975 em fusão ao <i>lacZ</i> .	Este trabalho
WT [<i>lacZ</i> -pv $vgrG3$]	Linhagem <i>C. violaceum</i> selvagem contendo a região promotora do gene CV_1432 em fusão ao <i>lacZ</i> .	Este trabalho
WT [<i>lacZ</i> -pv $vgrG4$]	Linhagem <i>C. violaceum</i> selvagem contendo a região promotora do gene CV_1233 em fusão ao <i>lacZ</i> .	Este trabalho
WT [<i>lacZ</i> -pv $vgrG6$]	Linhagem <i>C. violaceum</i> selvagem contendo a região promotora do gene CV_0016 em fusão ao <i>lacZ</i> .	Este trabalho
Plasmídeos	Características*	Origem/Referência
pNPTS138	Vetor suicida, Can ^r	M.R.K. Alley
pMR20	Vetor de complementação, Tet ^r	ROBERTS et al., 1996
pSEVA221	Vetor de complementação, Can ^r	SILVA-ROCHA et al., 2013
pGEM-T easy	Plasmídeo de clonagem, Amp ^r	Promega
pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor derivado de pRK2 com gene <i>lacZ</i> sem promotor, Tet ^r	GOBBER e SHAPIRO, 1992

* Abreviaturas: Can, canamicina; Tet, tetraciclina; Amp, ampicilina; r, resistência

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Todas as linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram cultivadas aerobicamente com agitação de 250 rpm a 37°C. As linhagens de *E. coli* DH5 α , utilizada

no processo de clonagem, e S17-1, utilizada no processo de conjugação, foram cultivadas em meio rico Luria-Bertani (LB) e suplementadas com tetraciclina (12 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml), quando necessário. As linhagens de *C. violaceum* listadas na Tabela 1 foram cultivadas em LB e quando necessário suplementadas com os antibióticos canamicina (50 µg/ml) e tetraciclina (12 µg/ml).

3.3. Análises *in silico*

Os parálogos de VgrGs no genoma completo de *C. violaceum* ATCC 12472 foram encontrados por buscas com a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência de aminoácidos e nucleotídeos de cada VgrG foi obtida pelo site KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>). A porcentagem de identidade das VgrGs foi descoberta através do alinhamento múltiplo da sequência das VgrGs, assim como o alinhamento das regiões promotoras desses genes, usando a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os domínios das proteínas VgrGs foram identificados utilizando o banco de dados Pfam (pfam.sanger.ac.uk/).

3.4. Técnicas de clonagem e biologia molecular

3.4.1. Reações de PCR

As regiões de interesse do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 foram amplificadas por PCR com enzima de alta fidelidade. Foram utilizados em cada reação: 0,5 ul do DNA genômico de *C. violaceum*, 0,5 ul de cada oligonucleotídeo a 50 µM (Tabela 2), 1,0 ul de dNTP mix a 10 mM, 10 ul de 5x Phusion HF Buffer, 0,5 ul de Phusion DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1,5 ul de DMSO e água mili-Q para um volume final de 50 µl. Foram utilizadas condições padrão de ciclagem nessas reações de PCR. Os fragmentos obtidos foram recuperados de gel de agarose 1%, seguindo protocolo do kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega).

3.4.2. Digestão do DNA com enzimas de restrição

As reações de digestão foram realizadas diretamente nos produtos de PCR (insertos) ou nos vetores de clonagem, por 2 horas a 37°C, com enzimas de restrição

apropriadas (Thermo Scientific), conforme os sítios de restrição adicionados aos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR (Tabela 2). A purificação dos DNAs digeridos foi realizada como descrito para os produtos de PCR.

3.4.3. Ligação, transformação e minipreparação de DNA

A ligação dos insertos aos vetores foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs) com o tampão apropriado *overnight* (aproximadamente 16 h) a 16°C. Procedeu-se com transformação das reações de ligação em uma alíquota (40 µl) de DH5α eletrocompetente por eletroporação em cubetas de 0,2 cm (Biorad), usando os seguintes parâmetros: 2500 V, 200 Ω, 25 µF. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 600 µl de meio LB, e mantidas a 37°C, 250 rpm por 1 hora. Em seguida, as bactérias foram espalhadas em placas de LB suplementadas com antibiótico adequado, e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As clonagens foram verificadas por PCR a partir destas colônias e os vetores com os insertos clonados foram extraídos por minipreparação de DNA com o kit Wizard plus SV Minipreps DNA purification System (Promega).

3.4.4. Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems) com oligonucleotídeos del1, del4, M13Fw ou M13Rv, que flanqueiam a região de clonagem, para verificar a sequência correta dos insertos (Tabela 2). As amostras foram precipitadas com isopropanol 62,5% e lavadas duas vezes com etanol 70%. O sequenciamento foi realizado em um aparelho ABI 3500XL do Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome	Sequência 5'- 3'	Descrição
CV3986_del1	taccggaagcttgtacttcgcgctattggcc	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> , 606 pb, mutação do gene CV_3986
CV3986_del2	taccggggaatccgctggcagatccatgatcg	
CV3986_del3	taccggggaatccctgaatgcgatcaaatccggc	Fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> , 663 pb, mutação do gene CV_3986
CV3986_del4	taccgggaattcttgccaatgcacgggctc	
CV3975_del1	taccggaagcttgccccgggcgggttttaag	Fragmento <i>HindIII/BamHI</i> , 598 pb, mutação do gene CV_3975
CV3975_del2	taccggggaatccgtccatggcgcaatctatccg	

CV3975_del3	taccggg <u>gat</u> ccgtggccgccaatgaagccg	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, 660 pb, mutação do gene CV_3975
CV3975_del4	taccggg <u>gaatt</u> ccaacaggtggtttgccgc	
CV1432_del1	taccggg <u>aagctt</u> cgccgccaactactagtc	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI, 626 pb, mutação do gene CV_1432
CV1432_del2	taccggg <u>gat</u> ccgtcaaggtccatcgattgtcc	
CV1432_del3	taccggg <u>gat</u> cttcccttctgtagagcagcc	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, 603 pb, mutação do gene CV_1432
CV1432_del4	taccggg <u>gaatt</u> ccggcaggaacgacgccaatc	
CV1233_del1	taccggg <u>aagctt</u> ccaggtccagatactgcg	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI, 611 pb, mutação do gene CV_1233
CV1233_del2	taccggg <u>gat</u> ccactggctagcaatgctttcag	
CV1233_del3	taccggg <u>gat</u> cccatttcaacatggtgccgtcg	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, 583 pb, mutação do gene CV_1233
CV1233_del4	taccggg <u>gaatt</u> cccctccagcgacttcatttc	
CV0023_del1	taccggg <u>aagctt</u> tggcatgttgcaacagcg	Fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI, 593 pb, mutação do gene CV_0023
CV0023_del2	taccggg <u>gat</u> cccagatccatcggttccaag	
CV0023_del3	taccggg <u>gat</u> ccccgacgtcccaagacaa	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, 657 pb, mutação do gene CV_0023
CV0023_del4	taccggg <u>gaatt</u> ctgcatagaacggtgtgccgg	
CV0016_del1	taccgggggcccagatgctaaggccggtgac	Fragmento <i>Apal</i> I/ <i>Bam</i> HI, 592 pb, mutação do gene CV_0016
CV0016_del2	taccggg <u>gat</u> ccgaagctggagaggaggtgt	
CV0016_del3	taccggg <u>gat</u> ccgcgagtaccaactgcccttc	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I, 632 pb, mutação do gene CV_0016
CV0016_del4	taccgggtcgacctccccatgaaatggatggcg	
M13_Fw	gtaaacgacggccagt	Confirmar clonagens por sequenciamento
M13_Rv	agcggataacaatttcac	
CV3986CompFw	taccggggtaccctcgatcgagctgcatgagc	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> HI, 2861 pb, complementação com gene CV_3986
CV3986CompRv	taccggg <u>gat</u> cccatccccctgttcattgcg	
CV3975CompFw	taccggggtacc <u>ccg</u> ccaatgtgcgcgattac	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> HI, 3019 pb, complementação com gene CV_3975
CV3975CompRv	taccggg <u>gat</u> ccggtgtcttgaacagcatgc	
CV1432CompFw	taccggggtacc <u>cg</u> gtctctcatgatcttgc	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> HI, 3554 pb, complementação com gene CV_1432
CV1432CompRv	taccggg <u>gat</u> ccgctatgggtcggtcatggc	
CV1233CompFw	taccggggtacc <u>cc</u> aggttccagatactggc	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI, 3506 pb, complementação com gene CV_1233
CV1233CompRv	taccggg <u>gaatt</u> cgacgcggtttatgcttggcc	
CV0023CompFw	taccggggtacc <u>cg</u> gtcccaagtctgtgtg	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> HI, 2952 pb, complementação com gene CV_0023
CV0023CompRv	taccggg <u>gat</u> ccctcggaagagaacggcatc	
CV0016CompFw	taccggggtaccgagatgctaaggccggtgac	Fragmento <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> HI, 3234 pb, complementação com gene CV_0016
CV0016CompRv	taccggg <u>gat</u> ccccggtctctaccagtaatc	

A região sublinhada indica os sítios das enzimas de restrição.

3.5 Construção das linhagens mutantes

As linhagens mutantes foram obtidas pelo método de troca alélica em vetor suicida, como já descrito para *C. violaceum* e padronizado em nosso laboratório (Figura 4) (DA SILVA NETO et al., 2012). As regiões flanqueadoras dos genes de cada VgrG foram amplificadas por PCR, ligadas entre si, reamplificadas como um produto único, o qual foi clonado diretamente no vetor pNPTS138, conforme descrito acima. As construções obtidas foram introduzidas em *C. violaceum* ATCC 12472 por conjugação com *E. coli* S17-1. Após 24 horas em placas LB, as conjugações foram espalhadas em placas de LB com canamicina (50 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) para a seleção da primeira recombinação homóloga (Figura 4). As colônias que cresceram nessas placas foram submetidas a PCR de colônia para confirmar a integração no genoma, com os oligonucleotídeos del1/del4 de cada gene (Tabela 2). Em seguida, essas colônias foram então cultivadas em 5 ml de meio LB líquido por 48 horas, sendo então plaqueadas em LB com sacarose 12%. Esta etapa visa selecionar bactérias nas quais ocorreu um segundo evento de recombinação, uma vez que o vetor pNPTS138 possui o gene *sacB*, que codifica uma enzima responsável pela hidrólise da sacarose, tendo como um co-produto da reação uma substância tóxica para as bactérias que ainda contém o vetor integrado. As colônias que cresceram em sacarose foram testadas quanto a sensibilidade em canamicina (50 µg/ml) (Figura 4). Após estas etapas de seleção, foi feito PCR de colônia para confirmação do mutante, utilizando os oligonucleotídeos del1/del4 (Tabela 2), pois a segunda recombinação pode levar a deleção do gene de interesse, ou a reversão ao genótipo WT. Para os mutantes múltiplos, o procedimento foi repetido de modo sequencial, partindo do mutante $\Delta vgrG1$ até o mutante sêxtuplo final $\Delta vgrG1-6$. As linhagens mutantes foram congeladas no freezer -80°C.

3.6 Construção das linhagens complementadas

Para a complementação, cada gene *vgrG* individual foi amplificado por PCR (Tabela 2) e clonado no vetor pMR20 ou pSEVA221 (Tabela 1), ambos de baixa cópia, e as construções obtidas foram introduzidas na linhagem mutante sêxtupla ($\Delta vgrG1-6$), ou na sua respectiva linhagem mutante, por conjugação. A complementação foi confirmada por PCR de colônias usando oligonucleotídeos CompFw e CompRv (Tabela 2) específicos para cada gene.

Figura 4: Estratégia utilizada para obtenção das linhagens mutantes nulas. Esquema com as principais etapas para construção de mutantes nulos, obtidos com deleção da região codificadora das VgrGs por meio de troca alélica. Em ambas as recombinações homólogas podem ocorrer dois eventos (linhas cheias e tracejadas), mas apenas os eventos das linhas cheias estão demonstrados na figura. Detalhes das etapas estão descritos no texto.

3.7 Curvas de crescimento

Foram feitas curvas de crescimento em meio rico LB para comparar o crescimento das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem de *C. violaceum*. Inicialmente, foi feito um pré-inóculo em 2 ml de LB a partir das linhagens que foram retiradas do freezer em placas LB. Este pré-inóculo foi mantido a 37°C, em uma agitação de 250 rpm, *overnight*. As culturas foram então diluídas para uma DO₆₀₀ inicial de 0,01 em 20 ml de meio LB. Os inóculos foram mantidos em uma agitação de 250 rpm, a uma temperatura de 37°C e, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 1 hora durante oito pontos, e no ponto de 24 horas para a medição da DO₆₀₀ em espectrofotômetro.

3.8 Ensaios de competição bacteriana

3.8.1. Ensaio de competição bacteriana qualitativo

Para verificar o papel das VgrGs em competição interbacteriana, a *C. violaceum* selvagem e os mutantes simples e múltiplos de *vgrGs* foram utilizados nos ensaios de competição contra *E. coli* e várias outras bactérias Gram-negativas, analisando a sobreposição da *C. violaceum* a outras bactérias, utilizando como indicativo a coloração roxa característica da *C. violaceum*. Para realizar esse experimento, as linhagens selvagem e mutantes de *C. violaceum*, além das bactérias *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa* (gentilmente cedidas pela professora Eliana Guedes), foram retiradas do freezer em placas LB e foi feito um pré-inóculo em 2 ml de LB líquido mantido a 37 °C em uma agitação de 250 rpm por 24 h. Após o período de incubação, as linhagens tiveram sua DO₆₀₀ ajustada para 1,0 em 1 ml. Foram misturados então 10 µl de cada mutante das VgrGs e da linhagem selvagem de *C. violaceum* com 10 µl de cada uma das bactérias (1:1). Em seguida, essa mistura foi colocada em placas LB, incubadas overnight a 37°C.

3.8.2. Ensaio de competição bacteriana quantitativo

Para esse ensaio utilizamos um protocolo previamente descrito (Figura 5) (ALCOFORADO DINIZ et al., 2017). As linhagens selvagem e mutantes de *C. violaceum* e a *P. aeruginosa* foram retiradas do freezer -80°C em placas LB e após o crescimento *overnight*, as bactérias foram ressuspensas em LB líquido e padronizadas em DO₆₀₀ 5,0. As bactérias atacantes (linhagens de *C. violaceum*) e presa (*P. aeruginosa*) foram misturadas na proporção de 5:1 e a mistura foi colocada em placas LB. A competição ocorreu durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, todo o *spot* foi recuperado utilizando um tubo de ensaio para o recorte do LB ágar. O *spot* recuperado foi então ressuspendido em LB e, logo após, foi feita uma diluição seriada até -6. Para um teste inicial, um pequeno volume (10 µl) de todas as diluições da diluição seriada foi adicionado em placas LB com canamicina (antibiótico seletivo para o crescimento apenas da presa). Após a incubação *overnight*, utilizamos a estimativa da recuperação da presa na placa teste para determinar a diluição que forneceria o número de colônias ideal para a contagem. Em seguida, um volume apropriado da diluição correta da co-cultura foi espalhado em uma placa LB com

canamicina, e a UFC (unidade formadora de colônia) foi contada após a incubação *overnight* (Figura 5). Foi possível assim analisar a redução de UFC destas bactérias presas após co-cultivo com a atacante, como descrito em vários estudos com T6SS (SCHWARZ et al., 2010; LIEN e LAI, 2017; RAY et al., 2017).

Figura 5: Esquema do ensaio de competição bacteriano. Após o crescimento em placas LB *overnight* as culturas foram ressuspensas, normalizadas para uma OD específica e misturadas em uma proporção de 5:1. Após a incubação por 4 horas, todo o *spot* foi recuperado utilizando um tubo de ensaio para recorte do ágar. Após a cultura ser transferida para o LB líquido através de agitação no vortex, foi feita uma diluição seriada. Toda a diluição foi plaqueada em uma placa teste suplementada com o antibiótico específico para que apenas a presa sobrevivesse. A melhor diluição foi plaqueada em placas LB suplementada com antibiótico seletivo, e após a incubação *overnight* as colônias foram contadas. Modificado de Alcoforado Diniz et al., 2017.

3.9 Ensaios de Western blot

Ensaios de *Western blot* foram utilizados para detecção de Hcp no extrato total e no sobrenadante das culturas de linhagens selvagem e mutantes de *vgrGs* de *C. violaceum* (redução de Hcp no sobrenadante destes mutantes indica perda do funcionamento do T6SS) (FLAUGNATTI et al., 2016). As linhagens foram inoculadas em 20 ml de LB ajustando a DO₆₀₀ para 0,01, seguido de cultivo a 37°C até uma DO₆₀₀ entre 2,5 e 3,0. Então, 1 ml dessa cultura foi separado e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos para a formação do pellet. Para as amostras do sobrenadante, 15 ml das culturas foram centrifugadas em falcon a 4000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 1 ml foi filtrado usando

filtros de 0,22 μm . Em ambos os casos, as amostras foram ressuspensas em tampão de corrida com SDS e DTT, ajustando os volumes de acordo com a DO_{600} . As amostras foram submetidas a corrida em gel SDS-PAGE 15%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por eletroforese com tampão de transferência. As membranas com as proteínas imobilizadas foram tratadas então com solução Ponceau-S por 5 minutos, para avaliar a eficiência da transferência e do carregamento. Após a lavagem com água destilada, a membrana foi bloqueada com TBS/leite 5%, sob agitação por 1 hora. Seguiu-se incubação com anticorpo anti-Hcp (anticorpo policlonal obtido no Doutorado da aluna Júlia Alves) ainda em solução TBS/leite por 2 horas. Após a incubação com o anticorpo, a membrana foi lavada em agitação 4 vezes com TBS-T (0,5 ml de Tween para 1 l de TBS) por 5 minutos e 1 vez com TBS 1X por 10 minutos. Utilizamos então o anticorpo secundário anti-mouse (Kit KPL protein detector) em TBS/leite 5% em agitação por 1 hora. Repetimos as lavagens e então adicionamos substrato do Kit KPL protein detector. Os resultados foram observados no fotodocumentador Amersham Imager 600.

3.10 Análise da atividade de β -galactosidase

As regiões promotoras dos genes *vgrGs* foram amplificadas por PCR, com os oligonucleotídeos del2 e CompFw de cada gene (Tabela 2), clonadas no plasmídeo pGEM-T easy e subclonadas no vetor repórter pRKlacZ290. Essas construções foram então introduzidas na linhagem de *C. violaceum* WT por conjugação. No dia anterior ao ensaio foi feito um pré-inóculo em 2 ml de LB com o antibiótico tetraciclina. A partir desse pré-inóculo foi feito um inóculo com DO_{600} inicial de 0,01 em 20 ml de LB incubado a 37°C e uma agitação de 250 rpm. Alíquotas foram retiradas 3, 4, 6, 8 e 16 horas após o início da incubação e sua absorbância foi lida a 600 nm. Em um tubo de 2 ml foram colocados 0,8 ml de tampão Z (Na_2HPO_4 177,99 g/mol; NaH_2PO_4 156,01 g/mol; KCl 74,55 g/mol; MgSO_4 246,47 g/mol; β -mercapto 78,13 g/mol), 0,2 ml da alíquotas de bactérias, 100 μl de clorofórmio e 25 μl de SDS 0,1%. Esses tubos foram vortexados e incubados por 5 minutos a 30°C. Adicionamos então 0,2 ml de ONPG (4 mg/ml em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0), incubamos novamente por 5 minutos a 30°C e para parar a reação utilizamos 0,4 ml de Na_2CO_3 1 M. Centrifugamos por 5 minutos e em seguida lemos a absorbância a 420 nm. As unidades de Miller foram calculadas utilizando os valores de OD a 600 e 420 nm.

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* das proteínas VgrGs do T6SS de *C. violaceum*

Um trabalho em andamento no laboratório identificou um *cluster* gênico no genoma de *C. violaceum*, compreendido entre os genes CV_3963 e CV_3991, no qual estão presentes os 14 genes considerados essenciais para o funcionamento da maquinaria do T6SS, incluindo dois genes *vgrGs* (Doutorado da aluna Júlia Alves). Para o presente trabalho, realizamos uma busca com a ferramenta Blast para verificar se haveriam outros genes *vgrGs* em *C. violaceum*. Por meio desta análise foram encontrados seis genes *vgrGs* no genoma de *C. violaceum*: além dos genes presentes no *cluster* principal, aqui chamados de *vgrG1* e *vgrG2*, foram encontrados quatro genes espalhados em outras regiões distantes do genoma, os quais chamamos de *vgrG3*, *vgrG4*, *vgrG5* e *vgrG6*, localizados em possíveis pequenos *clusters* de VgrGs órfãs associadas a potenciais proteínas efetoras (Figura 6). Optamos por numerar os genes *vgrGs* pela ordem sequencial no genoma, do maior (CV_3986, *vgrG1*) para o menor (CV_0016, *vgrG6*), de modo que os genes *vgrG1* e *vgrG2* seriam aqueles presentes no *cluster* principal.

Figura 6: Clusters gênicos contendo os genes *vgrGs* do T6SS de *C. violaceum*. Além do grande *cluster* contendo duas VgrGs, existem outros quatro pequenos *clusters* distribuídos pelo genoma de *C. violaceum* contendo quatro VgrGs órfãs.

Um alinhamento múltiplo destas seis proteínas VgrGs revelou alta identidade de sequência entre elas (de 70 a 93%), sugerindo que poderiam ser cópias parálogas com possível papel redundante (Figura 7A). Além disso, nossas análises também revelaram que as seis VgrGs têm a mesma organização de domínios (Figura 7B), contendo os dois domínios mínimos e típicos de proteínas VgrGs (PF05954 e PF10106), além de um

domínio adicional na região C-terminal (DUF2345), o qual tem sido recentemente descrito como importante para interação com efetores (FLAUGNATTI et al., 2016). Curiosamente, as proteínas VgrG3 e VgrG4 apresentam uma região extra no C-terminal, após o domínio DUF2345, pouco estruturada (Figura 7B). Portanto, a alta similaridade de sequência e conservação de domínios das seis proteínas VgrGs de *C. violaceum* levanta a questão se elas teriam papel redundante.

A

	VgrG1 (cv_3986)	VgrG2 (cv_3975)	VgrG3 (cv_1432)	VgrG4 (cv_1233)	VgrG5 (cv_0023)	VgrG6 (cv_0016)
VgrG1 (cv_3986)	100					
VgrG2 (cv_3975)	93.43	100	92.20	76.23	84.27	83.20
VgrG3 (cv_1432)	93.46	92.20	100	71.06	83.55	81.80
VgrG4 (cv_1233)	76.46	76.23	71.06	100	82.50	80.18
VgrG5 (cv_0023)	84.36	84.27	83.55	82.50	100	93
VgrG6 (cv_0016)	81.68	83.20	81.80	80.18	93	100

B

Figura 7: Análise *in silico* das proteínas VgrGs de *C. violaceum*. A. Porcentagem de identidade entre as seis proteínas VgrGs de *C. violaceum*. Dados obtidos a partir de alinhamento múltiplo com a ferramenta Clustal. B. Domínios das proteínas VgrGs de *C. violaceum*. Análise no banco de dados Pfam indicou presença dos dois domínios típicos de VgrGs (em verde e vermelho), um domínio adicional C-terminal (em azul), possível peptídeo sinal (em laranja), regiões de baixa complexidade (azul) e regiões desordenadas (cinza).

4.2 Construção das linhagens mutantes e complementadas das VgrGs de *C. violaceum*

Para investigar a possibilidade de redundância das VgrGs, foram construídos mutantes nulos individuais de cada um dos seis genes *vgrGs* ($\Delta vgrG1$, $\Delta vgrG2$, $\Delta vgrG3$, $\Delta vgrG4$, $\Delta vgrG5$ e $\Delta vgrG6$), além de mutantes com deleção sequencial destes genes ($\Delta vgrG1-2$, $\Delta vgrG1-3$, $\Delta vgrG1-4$, $\Delta vgrG1-5$ e $\Delta vgrG1-6$). Todos os mutantes nulos

foram obtidos pelo método de troca alélica em vetor suicida (Figura 4) (DA SILVA NETO et al., 2012), sendo que os mutantes individuais foram obtidos a partir da *C. violaceum* selvagem ATCC 12472, enquanto para os mutantes múltiplos, o procedimento foi repetido de modo sequencial, partindo do mutante $\Delta vgrG1$, até a obtenção de um mutante sem nenhum dos seis genes *vgrGs* ($\Delta vgrG1-6$). Todas estas linhagens mutantes foram confirmadas por meio de PCR de colônia (Figura 8).

A complementação das linhagens mutantes foi obtida pela clonagem de cada gene *vgrG* individual contendo, quando possível, região promotora própria, no plasmídeo pMR20 (ROBERTS et al., 1996), ou no plasmídeo pSEVA221 (SILVA-ROCHA et al., 2013), ambos vetores de baixo número de cópias. Todas estas construções de complementação foram introduzidas no mutante sêxtuplo $\Delta vgrG1-6$, ou nas respectivas linhagens mutantes, quando estas apresentaram fenótipos a serem complementados.

Figura 8: Confirmação das linhagens mutantes dos genes *vgrGs*. PCR de colônia para a confirmação das linhagens mutantes foram feitos com oligonucleotídeos del1 e del4, os quais amplificam as regiões flanqueadoras com os respectivos genes (1, WT) ou apenas as regiões flanqueadoras devido deleção dos genes (2, mutantes). Foram obtidas bandas do tamanho esperado para todos os mutantes (canaletas 2), assim como para a linhagem WT (canaletas 1). M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Em algumas reações também foram observadas bandas inespecíficas além dos produtos de amplificação de tamanhos esperados.

4.3 Perfil de crescimento das linhagens mutantes *vgrGs*

Para investigar se as linhagens mutantes apresentam diferença de crescimento em relação à linhagem selvagem (WT), foram feitas curvas de crescimento em meio rico LB (Figura 9). Os resultados indicaram que a deleção individual de cada *vgrG* (Figura 9A) ou mesmo a deleção sequencial das *vgrGs* até a remoção de todas elas (Figura 9B) não afetou o crescimento das linhagens, uma vez que não houve diferença no crescimento de nenhuma linhagem mutante quando comparados à linhagem WT. Estes resultados indicam que os genes *vgrGs* não são essenciais para o crescimento de *C. violaceum* em condições ótimas de cultivo.

Figura 9: Curvas de crescimento das linhagens mutantes *vgrGs*. A. Crescimento das linhagens mutantes simples com deleção de cada *vgrG*. B. Crescimento das linhagens de mutantes múltiplos. As bactérias foram cultivadas em meio LB e os pontos foram obtidos a partir da retirada de alíquotas e medição da DO_{600} de hora em hora durante 8 horas e no ponto de 24 horas.

4.4 Papel das VgrGs de *C. violaceum* na competição interbacteriana

Considerando o papel de T6SSs em competição entre bactérias (SANA et al., 2016; ANDERSON et al., 2017; PISSARIDOU et al., 2018), inclusive o T6SS de *C. violaceum* (Doutorado em andamento da aluna Júlia Alves), decidimos investigar a contribuição das proteínas VgrGs nesse processo (Figuras 10 e 11). Uma vez que já foi realizado um *screening* prévio que consiste no cocultivo de *C. violaceum* com diferentes espécies bacterianas, sendo elas tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (Doutorado Júlia Alves), foram escolhidas as linhagens bacterianas em que a *C. violaceum* WT tinha melhores vantagens competitivas quando comparada com as linhagens mutantes de um componente essencial da maquinaria do T6SS. A cor roxa da *C. violaceum* foi utilizada para diferenciar os cocultivos em que ela não conseguia crescer daqueles em que ela era capaz de se sobrepor às bactérias alvo.

Conforme esperado, a *C. violaceum* selvagem conseguiu se sobrepor a quase todas as bactérias testadas, enquanto que a linhagem mutante Δhcp , deficiente em um componente essencial da maquinaria do T6SS, perdeu quase que totalmente a capacidade de competir contra a maioria das bactérias (Figura 10). Ao observarmos o cocultivo das mesmas bactérias com as linhagens mutantes simples das VgrGs, percebemos que o mutante $\Delta vgrG3$ foi o único que teve diminuição da capacidade de se sobrepor à *P. aeruginosa*, de maneira semelhante a linhagem Δhcp , e em menores níveis à *E. coli* (Figura 10A). Essa observação nos levou a analisar os mutantes sequenciais das VgrGs (Figura 10B). Neste caso, percebemos uma perda drástica da capacidade de competir contra todas as bactérias testadas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. maltophilia*) a partir do mutante triplo das VgrGs 1, 2, 3 ($\Delta vgrG1-3$), alcançando níveis similares ao mutante do componente essencial da maquinaria, Δhcp (Figura 10B).

Além deste ensaio de competição bacteriana qualitativo, foi realizado também um ensaio de competição interbacteriana quantitativo (Figura 11), seguindo um protocolo pré-estabelecido (ALCOFORADO DINIZ et al., 2017), no qual é feita a quantificação da UFC da presa sem e com competição com a bactéria atacante em placas com antibiótico seletivo para a presa (Figura 11A). Neste ensaio, escolhemos como presa a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, a qual foi competida com a atacante *C. violaceum*. Após 4 horas de competição, conseguimos observar que, embora a maioria dos mutantes simples das VgrGs não tenha apresentado diferença significativa na competição com *P. aeruginosa* quando comparados com a linhagem selvagem de *C. violaceum*, o mutante

$\Delta vgrG3$ teve uma perda significativa da capacidade de competir contra a *P. aeruginosa*, porém em níveis inferiores ao controle (não competido) e ao mutante Δhcp (Figura 11B).

Figura 10: Ensaio de competição interbacteriana qualitativo dos mutantes *vgrGs*. A. Competição dos mutantes simples das *VgrGs*. B. Competição dos mutantes com deleção sequencial das *VgrGs*. Nos ensaios foram utilizados como controle a linhagem de *C. violaceum* WT e o mutante com deleção de um componente essencial da maquinaria, o Δhcp . A sobreposição da *C. violaceum* às bactérias indicadas competidoras é percebida pela coloração roxa.

Quando o mesmo ensaio foi efetuado com as linhagens de mutantes múltiplos das *VgrGs* foi possível observar que os níveis de recuperação da *P. aeruginosa* a partir do cocultivo com o mutante triplo, $\Delta vgrG1-3$, foram semelhantes aos níveis de recuperação da *P. aeruginosa* quando não houve competição, ou quando competida com o mutante Δhcp , níveis estes quatro logs acima da recuperação da *P. aeruginosa* ao competir com a

linhagem *C. violaceum* selvagem (Figura 11C). Assim, tanto o ensaio qualitativo quanto o ensaio quantitativo de competição demonstraram claramente que a VgrG3 é a mais importante para a atividade antibacteriana do T6SS de *C. violaceum*, com as demais cinco VgrGs apresentando um papel aparentemente mais acessório, pelo menos para as bactérias competidoras testadas, sobretudo a *P. aeruginosa*.

Figura 11: Ensaio de competição quantitativo dos mutantes *vgrGs* contra *P. aeruginosa*. A. Placa teste utilizada para a determinação da melhor diluição a ser plaqueada. *P. aeruginosa* não competida (LB) ou competida com *C. violaceum* selvagem (WT) em placa LB com canamicina. Recuperação da cepa alvo (*P. aeruginosa* ATCC 27853) após cocultura com os mutantes simples das VgrGs (B), ou com os mutantes múltiplos das VgrGs (C) como atacantes. Em todos os ensaios foram utilizados como linhagens controles a *C. violaceum* WT e o mutante Δhcp . Os pontos mostram a quantidade de ensaios biológicos independentes de cada competição ($n \geq 3$).

4.5 Análise do papel das VgrGs no funcionamento do T6SS de *C. violaceum*

Proteínas VgrGs são consideradas parte essencial da maquinaria para montagem e funcionamento do T6SS (CIANFANELLI et al., 2016a), mas no caso de *C. violaceum* que possui seis cópias de VgrG, tornou-se bastante interessante investigar quantas e quais

VgrGs são necessárias para que o T6SS continue funcional. Para responder esta questão foram realizados ensaios de *Western blot*, para detecção de Hcp no sobrenadante das culturas dos mutantes simples e múltiplos de *vgrGs*. Todos os componentes da maquinaria do T6SS precisam ser expressos para que ocorra a secreção do Hcp, e sendo ele um componente essencial da maquinaria, a detecção do Hcp no sobrenadante das culturas é um indicativo da funcionalidade do sistema (MURDOCH et al., 2011; CIANFANELLI et al., 2016a). A deleção individual das VgrGs de *C. violaceum* teve um pequeno impacto na secreção dependente do T6SS, com uma pequena diminuição da secreção de Hcp nos mutantes $\Delta vgrG1$ e $\Delta vgrG3$ (Figura 12A). Como esperado, não houve detecção de Hcp (extrato total ou sobrenadante) no mutante Δhcp , nem no sobrenadante do mutante $\Delta vipA$, o qual não produz a proteína da bainha do T6SS (Figura 12A e 12B). Consistente com os ensaios de competição, a deleção combinada das VgrGs 1, 2 e 3 resultou na perda da funcionalidade do T6SS, visto através da ausência de Hcp secretado em todos os mutantes múltiplos a partir do mutante triplo (Figura 12B). Estes resultados indicam que a ausência de algumas das proteínas VgrGs individuais teve pouco efeito no funcionamento do T6SS, mas neste caso, além da VgrG3, houve também um efeito individual da VgrG1.

Figura 12: Análise da secreção de Hcp em mutantes *vgrGs* por *Western blot*. A proteína Hcp foi detectada com anticorpo anti-Hcp nos sobrenadantes (sob) e extrato total (pellet) de culturas dos mutantes simples (A) ou mutantes múltiplos das VgrGs (B). Foram usados como controle a linhagem selvagem da *C. violaceum* (WT), assim como os mutantes Δhcp e $\Delta vipA$, deficientes no funcionamento do T6SS.

4.6 Complementação dos mutantes *vgrGs* de *C. violaceum*

A complementação de mutantes é fundamental para descartar quaisquer mutações ou efeitos secundários que poderiam contribuir para os fenótipos. Como apenas o mutante individual $\Delta vgrG3$ apresentou fenótipo de competição (Figura 10A e Figura 11B), este foi complementado com o gene *vgrG3* clonado no vetor pSEVA221. Como mostrado na figura 13A, a competição com o mutante $\Delta vgrG3$ com vetor pSEVA221 vazio, assim como com o mutante nulo $\Delta vgrG3$ resultou em pouca morte da *P. aeruginosa*. Esse fenótipo foi totalmente revertido na linhagem complementada com *vgrG3*, pois esta matou a *P. aeruginosa* em níveis semelhantes a *C. violaceum* WT.

Figura 13: Complementação de mutantes *vgrGs* de *C. violaceum*. A. Ensaios de competição quantitativo com a complementação do mutante $\Delta vgrG3$. B. Ensaio de competição com o mutante sextuplo das *VgrGs* ($\Delta vgrG1-6$) recebendo cada gene *vgrG* separadamente. Ambos os ensaios de competição tiveram como presa a *P. aeruginosa*. Os pontos mostram a quantidade de ensaios biológicos independentes de cada competição ($n \geq 3$). C. Western blot com o mutante sextuplo ($\Delta vgrG1-6$) recebendo cada gene *vgrG* separadamente, usando anticorpo anti-Hcp. Foram usados como controle a *C. violaceum* WT, Δhcp e $\Delta vipA$. Foram usados sobrenadantes (sob) e extrato total (pellet) das culturas.

Outra estratégia para estudar o papel individual das VgrGs de *C. violaceum* foi introduzir cada gene *vgrG*, clonado no pSEVA221 ou no pMR20, no mutante sêxtuplo sem nenhum gene *vgrG* ($\Delta vgrG1-6$) e analisar se haveria restauração da capacidade de competição (Figura 13B) e da secreção de Hcp (Figura 13C) nestas linhagens. A presença de *vgrG3* no mutante $\Delta vgrG1-6$ restaurou totalmente sua capacidade de competição e de secreção de Hcp, enquanto a presença de cada um dos outros cinco genes *vgrGs* não causou nenhuma melhora na competição e resultou em pequena secreção de Hcp (Figura 13B e 13C). Esses dados enfatizam ainda mais a necessidade da VgrG3 para a competição contra *P. aeruginosa* e reafirmam que a VgrG3 tem papel preponderante no funcionamento do T6SS de *C. violaceum*.

4.7 Análise da região promotora e da expressão dos genes *vgrGs*

Considerando que as proteínas VgrGs de *C. violaceum* apresentam alta identidade de sequência (Figura 7), realizamos uma análise das regiões promotoras dos genes *vgrGs* para verificar se estas regiões também são conservadas. Foi realizado um alinhamento múltiplo das regiões promotoras dos quatro genes *vgrGs* órfãos, uma vez que os genes *vgrG1* e *vgrG2* do *cluster* grande não parecem ter seu próprio promotor por estarem internos em operons (Figura 6). Este alinhamento revelou a quase ausência de conservação nas regiões promotoras dos quatro genes *vgrGs*, mas foi identificada uma pequena região bastante conservada entre elas (Figura 14). Trata-se de uma sequência repetida invertida que coincide com dois sítios de ligação do regulador de QS CviR, preditos previamente por análise *in silico* (STAUFF e BASSLER, 2011), sugerindo que as quatro VgrGs de *C. violaceum* poderiam ser reguladas por QS.

Para estudar a expressão dos genes *vgrGs*, foram feitas tentativas de clonar as regiões promotoras destes seis genes no plasmídeo pRKlacZ290, que contém um gene repórter *lacZ* sem promotor. As construções obtidas para *vgrG2*, *vgrG3*, *vgrG4* e *vgrG6* foram introduzidas em *C. violaceum* selvagem para realização de ensaios de atividade de beta-galactosidase ao longo da curva de crescimento (Figura 15). Para as construções *pvgrG2* e *pvgrG6* foi detectada apenas uma atividade basal em qualquer tempo analisado da curva de crescimento. No caso de *vgrG2*, isto confirma que não há um promotor próprio e sua expressão deve ser regulada a partir do promotor do operon. Já para *pvgrG3* e *pvgrG4* houve um aumento de duas vezes na atividade comparando a fase exponencial com a fase estacionária, sugerindo uma regulação destes genes dependente da fase de

crescimento, possivelmente via QS. Vale destacar que o promotor de *vgrG3* é bem mais expresso do que o promotor de *vgrG4* (Figura 15), o que corrobora o papel mais central de VgrG3 no T6SS de *C. violaceum*.

CV_0023	GCCTGATTTCGTTCCGGACAACGGGAAGGACAAGAAGCGATCAGCGGCACTGGCCGCCGCT	60
CV_0016	-----	0
CV_1233	-----CAAGGGCTTTTACTGCTTCAATAGAGGGAGTCGCGCC	37
CV_1432	-----GATCTT---GCCCTCCGCCGTACGGACTGGCTTT	31
CV_0023	GCCTGATGGCGCGTCAAGACCAGCCACTGCG-----CATTGAAAGTGGAAACGGGA	109
CV_0016	-----TGTACCCAGGCTAAAT-----AAGCCAT---TCCACTACTTGAGTGGTA	41
CV_1233	CCACGCGGGTGCCTGGATTGAAACATCTGCATGCATAGACCGAGCAATAGTTTGGAGGTC	97
CV_1432	CAGG--TTAGACCCTGATAAAAAAATCTCAGCTAGTACA---AAT-----AACTA	76
	+ +	
CV_0023	GGGAGCAATCACCATGAGTGAAGGCCATGGTGGTTCCAGGGTTGGCAGGGCAGG-----G	164
CV_0016	GTGCGCCTATC-----CGCAGGTAC-----GTGAAGG-----	68
CV_1233	GTGCGCCATGCGGGCGAGTGGATTGA--AACAGTTGGAGGGAGGGAGCAGTCGCGCCTAG	155
CV_1432	GCGTGGCATCCTCAAGCATGGCTGCC--GACGGATGCGGGCAGCCCGTGAACGGGACGG	134
	+ + + + +	
CV_0023	ATGCGACGGCGCCTGAGGCTGCGGTTCCCGGCTG-----CCGGCCAGGCGCTGGCTCGCG	219
CV_0016	-----GCAAGGAGCCCTTG-----AACACATCAAGCGCA	97
CV_1233	CTGTGGT--CGCGCCCATGTGGGCGCGTGGACTGAAACAACATGGCGGCGTTGATTAGCA	213
CV_1432	CTATCGCTTCACGGCGAAAGACGATTCCGCCCTTCGGCCCCGTGCGATCGATAACTCGCC	194
	+ ++	
CV_0023	CCCGGTCGGGAGGACTTTCTCGCGGG--AGGACACCCATGTCCC--ACCCACAGCTTACCC	277
CV_0016	TACGTGGAG-----GTTGCCGCCATTAAATATGCTTTTGC-----	133
CV_1233	TGCGGATCTGGG--CCTATCACGATGTGGATTAGCTGATGACCTGCATCCATGCTG---	267
CV_1432	CCATGCTCTGATGGCCTAACAAAGCAGTGGATTCCAAACGCCG--CTTGCCGTCATA---	249
	+ +	
CV_0023	GGCACAAAGTTCGCGCATCCTATGCAACCC--ACAACAGGGCGGTCCCAAGTCT-----TG	331
CV_0016	-----	133
CV_1233	GCCGAGAGCGTGACGGTG--TTTTGCTGACTGAAATGGGGACTTATACAAGTGTGTGATG	326
CV_1432	ATCGCAAGCCTGACGCCTGTTTTTCTCCCGCCTCCAGCCCTG-----	292
CV_0023	CTGTGTTCAAACAGGCTACGGAGGCGCTACCTGGTTCTAATAGGAGCTTTCAAGCTGCCGA	391
CV_0016	-----AATATCTGCAGGTGCTTA-----GTTGCGTGA	160
CV_1233	GTGTTTCCATAGACTATTTTCAGAGCCGCT-----ATTGGGGGC	365
CV_1432	-----ACGCCCGCC-----CCTG-----	305
	+ +	
CV_0023	TTGAACTGCGCTCCCTGTCTTTTAGTGACATCCGCTCATTTCCTGTCAAAGCCGGCTTG	451
CV_0016	AAGCTTCTTTTAACTGTCTCTTTAGGTCAGGTAATTGGACGCGCTGATTTGCAAGCCTG	220
CV_1233	GCATTGTTTTTAACTGTACTTTGGTGTAGGTTATTGAGCTTCCGGCTAGGTTGCCCTG	425
CV_1432	TCCTGCAGTCATACTGTCTCTTTAGTTCAGGTTTCGTTAGCGAATGAGAATGTTTCGCCCTTG	365
	+ + + + + + + + +	
CV_0023	TTGTCGCGT--CCGCAACGTCAATAGAATCC--TAATCTCCTTCCCACTCAATGACATAC	507
CV_0016	TTAAGGAAAGAGATGGCCAATCTAAATAAATTGGGCTATTTCATGCGCATCAATACTAGA	280
CV_1233	TAGGTGGTC--TGGTATTTTCATAACATTCTTAATCTTCTTTTGTAGT-TCAATGACATAC	482
CV_1432	TTGACGCGA--TGCTTCCACATAAAATGCTGGTTCTTTTCGGTTTTCTCACTTTCAAGT	423
	+ + + + + +++ +	
CV_0023	CTTCTCCAGAAGGTATCTTCGCTGGAACGCCG-----	540
CV_0016	ACCGGTTGCTGGGTTCTTTCTTTTCCAGTTCGGATTGCC	320
CV_1233	CCTCGCTGGAGGGTATTTATATTTGGATTCTTG-----	515
CV_1432	CCTGCTTCAAGGGCGTTTTCTGTTTTGGACAATCG-----	457
	++ + +	

Figura 14: Alinhamento múltiplo das regiões promotoras dos genes *vgrGs* órfãos. Análise realizada com a ferramenta Clustal Omega. Marcados em vermelho, os sítios de ligação do CviR descritos por STAUFF e BASSLER, 2011. O quadrado amarelo mostra a região de maior conservação entre essas sequências. * Resíduos de nucleotídeos conservados.

Figura 15: Ensaio de atividade de β -galactosidase de promotores de genes *vgrGs*. (A-D) As construções com os promotores dos genes *vgrGs* indicados foram introduzidas em *C. violaceum* selvagem. O ensaio foi realizado com culturas cultivadas em meio LB nos tempos indicados ao longo da curva de crescimento.

Apesar de as construções dos promotores de *vgrG1* e *vgrG5* ainda estarem em andamento, os dados obtidos até agora indicam um perfil de expressão distinto para os diferentes genes *vgrGs*, assim como foram distintos os efeitos da ausência de cada VgrG para o funcionamento e atividade antibacteriana do T6SS de *C. violaceum*.

5 DISCUSSÃO

Dentre os arsenais utilizados por bactérias para eliminar competidores, o disparo de efetores tóxicos por meio do T6SS tem se mostrado um dos mecanismos mais sofisticados e elegantes (CIANFANELLI et al., 2016a; GARCÍA-BAYONA e COMSTOCK, 2018). Em poucos anos, os componentes essenciais da maquinaria do T6SS foram identificados e suas funções vem sendo rapidamente elucidadas, ultrapassando o conhecimento acumulado em relação a outros sistemas de secreção (COSTA et al., 2015; GALÁN e WAKSMAN, 2018). No entanto, diversos aspectos relacionados a como os efetores são carregados e entregues nas células alvo (bacteriana ou eucariótica) ainda não estão devidamente investigados e parecem haver diversas possibilidades, com efetores se associando a Hcp, VgrG ou PAAR diretamente ou através de proteínas adaptadoras (ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; HACHANI et al., 2016). Além disso, o papel da proteína VgrG como um componente essencial da maquinaria do T6SS em casos nos quais VgrG ocorre em múltiplas cópias, ainda é pouco estudado.

A *Chromobacterium violaceum* é um bom modelo para investigar competição. De fato, é bem conhecido que a *C. violaceum* antagoniza outros organismos por competição à distância mediada por moléculas secretadas (DURÁN et al., 2016; BATISTA e DA SILVA NETO, 2017). Por exemplo, *C. violaceum* mata *Staphylococcus aureus* através da violaceína entregue em vesículas extracelulares (ARULDASS et al., 2018; BATISTA et al., 2020), enquanto a *Chromobacterium* Csp_P apresenta atividade mediada por metabólitos secretados contra mosquitos *Anopheles* e *Aedes* (RAMIREZ et al., 2014). Porém, não há trabalhos publicados descrevendo competição dependente de contato em *C. violaceum*. Dados em andamento do nosso grupo (Doutorado da aluna Júlia Alves) indicam que a *C. violaceum* possui um T6SS funcional com atividade antibacteriana que potencialmente oferece vantagem na sua interação com outras bactérias no ambiente, mas a função de proteínas VgrGs neste T6SS ainda não foi investigada. Neste presente trabalho, estudamos as VgrGs de *C. violaceum*. Identificamos que esta bactéria possui seis VgrGs, todas elas com a mesma organização de domínios. A obtenção e caracterização de linhagens mutantes com deleção individual ou combinada dos seis genes *vgrGs* revelou que a VgrG3 possui papel preponderante em relação às outras cinco VgrGs, seja no funcionamento do T6SS (secreção de Hcp) ou em sua atividade antibacteriana (competição contra *P. aeruginosa*). Análise da atividade

promotora dos genes *vgrGs* indicou que *vgrG3* e *vgrG4* são mais expressos em alta densidade celular, possivelmente via ativação pelo regulador de QS CviR.

Muitas bactérias possuem um único T6SS, enquanto algumas outras possuem mais de um, sendo que em ambos os casos os genes estão organizados em grandes *clusters* no genoma. Por exemplo, existem três *clusters* completos em *P. aeruginosa*, seis *clusters* em *Burkholderia pseudomallei* e quatro *clusters* em *Yersinia pseudotuberculosis*. Nos casos de um único organismo possuir mais de um T6SS, geralmente estes são regulados diferencialmente e podem realizar diferentes funções (SHALOM et al., 2007; ZHANG et al., 2011; SANA et al., 2012; ALLSOPP et al., 2017; PAN et al., 2018). Através de análises *in silico* neste presente trabalho identificamos seis genes *vgrGs* presentes no genoma da *C. violaceum*, sendo dois deles localizados em um *cluster* principal com genes da maquinaria do T6SS, e os outros quatro dispersos em pequenos *clusters* no genoma. Da mesma forma, outras bactérias que possuem um único T6SS podem conter mais de um gene *vgrG* no genoma em *clusters* órfãos (ZHENG e LEUNG, 2007; BOYER et al., 2009; ZOUEID et al., 2014; ZONG et al., 2019), contudo ainda não está claro a necessidade de se ter várias cópias de genes *vgrGs*.

A entrega de efetores pelo T6SS envolve a contração da bainha VipAB, impulsionando o aparato perfurante Hcp/VgrG/PAAR com os efetores em direção a célula-alvo (CIANFANELLI et al., 2016a). A VgrG forma uma estrutura trimérica e se comporta com um centro para a formação do tubo de Hcp, sendo assim um componente essencial para a montagem e o funcionamento da maquinaria (SHNEIDER et al., 2013; HACHANI et al., 2014; ZOUEID et al., 2014; RENAULT et al., 2018). Os domínios de VgrGs incluem os domínios semelhantes aos gp27 e gp5 de bacteriófagos (N-terminal e central), além de domínios efetores ou adaptadores adicionais na porção C-terminal. Quando as regiões C-terminais das VgrGs são domínios citotóxicos, elas são chamadas VgrGs ‘evoluídas’ ou especializadas (WHITNEY et al., 2014; ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; RENAULT et al., 2018). Nossa análise de domínios das seis VgrGs de *C. violaceum* revelou que todas elas contêm os domínios gp27 e gp5, normalmente encontrados em proteínas VgrGs, assim como um domínio DUF2345 no C-terminal. Em *Escherichia coli* entero-agregativa (EAEC) descobriu-se que o domínio DUF2345 e um domínio adicional chamado de TTR, pois se dobra como um domínio semelhante a transtirretina, são responsáveis pela seleção e transporte de efetores do T6SS, mais especificadamente a fosfolipase Tle1 (FLAUGNATTI et al., 2016). Devido à falta de domínios C-terminais citotóxicos, acreditamos que nenhuma das VgrGs de *C. violaceum*

seja do tipo especializada, assim como as 10 VgrGs da *Burkholderia cenocepacia* K46-2, e as 2 VgrGs de *Serratia marcescens* (AUBERT et al., 2015; CIANFANELLI et al., 2016b). Embora não tenhamos conseguido modelar as regiões desestruturadas encontradas na parte final de VgrG3 e VgrG4, acreditamos que possam ser o motivo TTR da VgrG de *E. coli*.

As proteínas com domínio PAAR afiam o pico do aparato perfurante ao se ligarem a β -hélice do trímero de VgrGs, além de auxiliarem na interação de VgrGs com efetores cargo (SHNEIDER et al., 2013; HACHANI et al., 2014; WOOD et al., 2019). Já foi descrito em bactérias como *S. marcescens*, *P. aeruginosa* e *Agrobacterium tumefaciens* que cada proteína PAAR interage com uma proteína VgrG específica (CIANFANELLI et al., 2016b; COULTHURST, 2019). Em alguns casos, o domínio PAAR é parte de toxinas contendo repetições Rhs que possuem atividade de nuclease (COULTHURST, 2019; WOOD et al., 2019). Como identificamos no genoma de *C. violaceum* genes que potencialmente codificam uma proteína PAAR (*cluster* principal do T6SS) e algumas proteínas com repetições Rhs (próximos a *vgrG3* e *vgrG4*), será interessante investigar futuramente se estas proteínas interagem com as diferentes VgrGs e se as proteínas Rhs são toxinas antibacterianas.

Para responder a pergunta central deste trabalho, qual seja, se existe redundância entre as seis proteínas VgrGs de *C. violaceum*, adotamos duas estratégias: (i) deleção individual de cada gene *vgrG* e, em seguida, deleção sequencial até obter uma linhagem mutante sêxtupla; (ii) reintrodução de cada gene *vgrG* no mutante sêxtuplo. As construções foram bem sucedidas, sugerindo que os genes *vgrGs* não são essenciais para a viabilidade da *C. violaceum*. Esses mutantes não apresentam taxas de crescimento diferentes da linhagem selvagem, como foi visto por ensaio de curva de crescimento. Um trabalho recente, estudando redundância de proteínas VgrGs, sugere que uma identidade de sequência de aminoácidos $\geq 95\%$ se reflete em redundância funcional destas proteínas (SANTOS et al., 2020). Embora as seis VgrGs de *C. violaceum* tenham apresentado alta identidade de sequência, os valores não chegam a este patamar.

A secreção de Hcp tornou-se a marca válida de um T6SS funcional em várias espécies bacterianas. Sendo assim, realizamos ensaios de *Western blot* a fim de avaliarmos a secreção de Hcp nos mutantes *vgrGs* de *C. violaceum*. Dos seis mutantes individuais, apenas $\Delta vgrG1$ e $\Delta vgrG3$ tiveram uma diminuição da secreção de Hcp. A partir da deleção tripla $\Delta vgrG1-3$ não houve mais secreção de Hcp. A ausência de secreção no mutante sêxtuplo foi totalmente revertida na presença de *vgrG3* e fracamente

recuperada com os outros genes *vgrGs*. Estes dados indicam que há pouca redundância entre as VgrGs para o funcionamento do T6SS de *C. violaceum*, sendo a VgrG3 a mais importante para manter o sistema funcional. Resultados distintos, indicativos de maior redundância funcional, tem sido descritos em outras bactérias: em *B. cenocepacia* a deleção individual de qualquer um dos 10 genes *vgrGs* não teve qualquer impacto na secreção de Hcp (AUBERT et al., 2015); em *S. marcescens*, apenas quando foi feita a deleção dos dois genes *vgrGs* houve perda da secreção de Hcp, não havendo nenhum efeito nos mutantes individuais (CIANFANELLI et al., 2016b); em *A. tumefaciens*, o mesmo fenômeno, apenas deleção dos quatro genes *vgrGs* interrompeu secreção de Hcp (SANTOS et al., 2020). Por outro lado, em *Aeromonas hydrophila* e *V. cholerae*, a deleção individual de VgrGs aboliu a exportação de Hcp (VgrG 2 e 3 em *A. hydrophila* e VgrGs 1 e 2 em *V. cholerae*), enquanto a VgrG1 de *A. hydrophila* e a VgrG3 de *V. cholerae* não influenciaram nessa secreção (PUKATZKI et al., 2007; SHA et al., 2013). Pode-se concluir então que a exportação de Hcp e VgrG depende uma da outra, e em casos de muitos genes *vgrGs*, a secreção de Hcp pode depender ou não de VgrGs individuais.

Embora atue também secretando efetores em células eucarióticas, a maioria dos T6SSs são dedicados a secreção de efetores antibacterianos (PUKATZKI et al., 2007; ALCOFORADO DINIZ et al., 2015; CIANFANELLI et al., 2016a). Na literatura é possível encontrar vários T6SSs importantes na competição interbacteriana, como os T6SS de *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Acinetobacter baumannii* e *S. marcescens* (MACINTYRE et al., 2010; MURDOCH et al., 2011; RUSSELL et al., 2012; CARRUTHERS et al., 2013). No caso de *C. violaceum*, dados do laboratório indicam papel do T6SS na competição contra bactérias como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*. No presente trabalho, utilizando um ensaio quantitativo de competição contra *P. aeruginosa*, definimos que das seis VgrGs, a VgrG3 é a que desempenha maior papel nessa competição, uma vez que (i) apenas o mutante individual $\Delta vgrG3$ teve forte redução na capacidade de matar a *P. aeruginosa*; (ii) a partir do mutante triplo $\Delta vgrG1-3$ houve perda total da competição mediada pelo T6SS; (iii) apenas VgrG3 reverteu a capacidade de competição do mutante sêxtuplo. Estes dados são consistentes com os nossos ensaios de secreção de Hcp usando estes mutantes. De forma semelhante, a VgrG2 de *S. marcescens* parece ter um papel maior em relação a VgrG1 na competição contra *Pseudomonas fluorescens* e *E. coli* (CIANFANELLI et al., 2016b).

Complexos heterotriméricos e homotriméricos de VgrG foram observados em *P. aeruginosa* e *V. cholerae*. A natureza dos complexos de proteínas VgrGs que podem ser

formados depende da quantidade de VgrGs presentes no genoma da bactéria e da redundância entre essas proteínas (PUKATZKI et al., 2007; LEIMAN et al., 2009; HACHANI et al., 2011; DONG et al., 2013). Os dados obtidos neste presente trabalho indicam pouca redundância funcional das seis VgrGs de *C. violaceum*, com a proteína VgrG3 desempenhando um papel mais importante em relação as outras cinco VgrGs. Um modelo plausível seria a VgrG3 formando heterotrímeros com cada uma das demais cinco VgrGs, permitindo que estas VgrGs, carregadas com os efetores codificados por genes próximos a cada gene *vgrG*, pudessem efetuar a entrega de efetores antibacterianos distintos. Para aumentar a consistência deste modelo, além de determinar a natureza dos complexos de VgrGs por estudos de interação proteína-proteína, serão necessários mais estudos investigando o potencial tóxico dos efetores preditos e a interação destes com cada VgrG. Outro ponto fundamental a ser investigado é se os genes *vgrGs* introduzidos no mutante sêxtuplo estão sendo realmente expressos e em que níveis. Um cenário com algumas das VgrGs atuando em homotrímeros também seria possível.

Os genes do T6SS estão integrados em vários circuitos de regulação, incluindo regulação por QS (HO et al., 2014; ALLSOPP et al., 2017). Um estudo com o regulador de QS CviR usou o sítio de ligação deste regulador mapeado no promotor do operon de síntese da violaceína para fazer uma busca *in silico* no genoma de *C. violaceum* (STAUFF e BASSLER, 2011). Esta análise identificou 22 potenciais sítios de ligação de CviR em regiões promotoras, incluindo as regiões promotoras de *vgrG3* e *vgrG6*. Dentre os genes validados como ativados por CviR estava o *vgrG3* (STAUFF e BASSLER, 2011). Em nossas análises *in silico* identificamos que o sítio de ligação do CviR na região promotora de *vgrG3* é altamente conservado nos promotores dos quatro genes *vgrGs* órfãos, sugerindo que estes genes seriam regulados por QS. Quando realizamos ensaios de β -galactosidase durante toda a curva de crescimento, constatamos uma regulação dependente da fase de crescimento nos promotores de *vgrG3* e *vgrG4*, embora a dependência de CviR para a ativação observada em alta densidade celular ainda necessite ser demonstrada. De forma semelhante, o *cluster* H2-T6SS de *P. aeruginosa* parece ser regulado por fase de crescimento, uma vez que o perfil de atividade da β -galactosidase aparentava uma baixa expressão do *cluster* durante a fase exponencial e um aumento da expressão na fase estacionária (SANA et al., 2012). Comparando a atividade promotora dos quatro *vgrGs* testados, verificamos claramente que *vgrG3* é o mais expresso, o que é consistente com o nosso modelo de VgrG3 atuando como a VgrG mais importante para o funcionamento do T6SS de *C. violaceum*.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho identificamos seis genes *vgrGs* no genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum* e por meio de estudos funcionais com linhagens mutantes determinamos que as proteínas VgrGs desta bactéria contribuem de modo distinto para o funcionamento e atividade antibacteriana do seu sistema de secreção do tipo VI. As principais conclusões do trabalho foram:

- ✓ Os seis genes *vgrGs* estão distribuídos em um padrão usual no genoma de *C. violaceum*, com os genes *vgrG1* e *vgrG2* localizados no *cluster* principal do T6SS e os demais quatro genes *vgrGs* localizados em *clusters* órfãos. Estes genes codificam seis proteínas VgrGs que apresentam alta similaridade de sequência e a mesma organização de domínios. Todas as VgrGs possuem um domínio adaptador no C-terminal ao invés de um domínio citotóxico;
- ✓ Nenhum dos genes *vgrGs* é essencial para a *C. violaceum* em condições favoráveis de cultivo, pois foi possível obter linhagens mutantes individuais de cada um dos seis genes *vgrGs*, além de mutantes sequenciais desses genes até o mutante sêxtuplo sem nenhum gene *vgrG*;
- ✓ Há pouca redundância entre as VgrGs para o funcionamento do T6SS de *C. violaceum*, sendo a VgrG3 a mais importante para manter o sistema funcional, pois dos seis mutantes individuais, $\Delta vgrG1$ e $\Delta vgrG3$ tiveram uma diminuição da secreção de Hcp, esta secreção foi abolida a partir da deleção tripla $\Delta vgrG1-3$ e a ausência de secreção no mutante sêxtuplo foi totalmente revertida na presença de *vgrG3* e fracamente recuperada com os outros genes *vgrGs*.
- ✓ Das seis VgrGs, a VgrG3 é a que desempenha um papel mais importante na competição bacteriana contra *P. aeruginosa*, uma vez que apenas o mutante individual $\Delta vgrG3$ teve forte redução na capacidade de matar a *P. aeruginosa*, a partir do mutante triplo $\Delta vgrG1-3$ houve perda total da competição mediada pelo T6SS e apenas VgrG3 reverteu a capacidade de competição do mutante sêxtuplo;
- ✓ Tanto o *vgrG3* quanto o *vgrG4* apresentaram aumentada expressão em alta densidade celular, sugerido regulação por QS. Comparando a atividade promotora dos quatro genes *vgrGs* testados, o *vgrG3* é o mais expresso, o que é compatível com o papel preponderante de VgrG3 no T6SS de *C. violaceum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOFORADO DINIZ, J.; HOLLMANN, B.; COULTHURST, S. J. Quantitative determination of anti-bacterial activity during bacterial co-culture. **Methods in Molecular Biology**, v. 1615, p.517-524, 2017.
- ALCOFORADO DINIZ, J.; LIU, Y.-C.; COULTHURST, S. J. Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. **Cellular Microbiology**, v. 17, p. 1742-1751, 2015.
- ALLSOPP, L. P.; WOOD, T. E.; HOWARD, S. A.; et al. RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, p. 7707-7712, 2017.
- ALTERI, C. J.; MOBLEY, H. L. The versatile Type VI secretion system. **Microbiology Spectrum**, v. 4, VMBF-0026-2015, 2016.
- ANDERSON, M. C. et al. *Shigella sonnei* encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 6, p. 769-776.e3, 2017.
- ARULDASS, C. A. et al. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5164–5180, 2018.
- ASFAHL, K. L.; SCHUSTER, M. Social interactions in bacterial cell-cell signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 92–107, 2017.
- AUBERT, D. F.; HU, S.; VALVANO, M. A. Quantification of type VI secretion system activity in macrophages infected with *Burkholderia cenocepacia*. **Microbiology** (United Kingdom), v. 161, n. 11, p. 2161–2173, 2015.
- BADR, S.; LI, Y.; DUAN, K. Comparison of the structure, regulation and functions between type three and type six secretion system in Gram-Negative bacteria. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 5, n. 4, p. 5–8, 2016.
- BASLER, M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. **Philosophical Transactions Royal Society London B**, v. 370, 20150021, 2015.
- BASLER, M.; PILHOFER, M.; HENDERSON, G. P.; JENSEN, G. J.; MEKALANOS, J. J. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. **Nature**, v. 483, n. 7388, p. 182-186, 2012.
- BATISTA, J. H. et al. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2432-2442, 2020.

- BATISTA, J. H.; DA SILVA NETO, J. F. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: Updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2213, 2017.
- BERGONZINI, C. Um nuevo bacterio colorato, **Annals Soc. Natural. Modena. Ser.**, v. 2, p. 149–158, 1881.
- BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 94, p. 562-563, 1882.
- BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, 2009.
- CARRUTHERS, M. D. et al. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- CHASSAING, B.; CASCALES, E. Antibacterial weapons: Targeted destruction in the microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 329–338, 2018.
- CHEN, L.; ZOU, Y.; SHE, P. et al. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v. 172, p. 19-25, 2016.
- CIANFANELLI, F. R. et al. VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 1–27, 2016b.
- CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L.; COULTHURST, S. J. Aim, load, fire: The Type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 51-62, 2016a.
- COSTA, T. R. D.; FELISBERTO-RODRIGUES, C.; MEIR, A.; et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 343–359, 2015.
- COULTHURST, S. The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 5, p. 503–515, 2019.
- DA SILVA NETO, J. F.; NEGRETTO, C. C.; NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a Cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- DE SOUZA, A. O. et al. In vitro activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 59-62, 1999.
- DELEPELAIRE, P. Type I secretion in Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** V. 1694, Issues 1–3, p. 149-161, 2004.
- DEMOSS, R. D.; EVANS, N. R. Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. **J. Bacteriol.**, v. 78, p.583-8, 1959.

- DONG, T. G. et al. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 7, p. 2623–2628, 2013.
- DURÁN, M; FALJONI-ALARIO, A.; DURÁN, N. *Chromobacterium violaceum* and its important metabolites – review. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 6, p. 535-547, 2010.
- DURÁN, N.; JUSTO, G.Z.; DURÁN, M. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1030-1045, 2016.
- DURÁN, N.; MENCK, C.F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 27, p. 201–222, 2001.
- DURAND, E.; CAMBILLAU, C.; CASCALES, E.; JOURNET, L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: The versatile arsenal of Type VI secretion effectors. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 498–507, 2014.
- FANTINATTI-GARBOGGINI, F. et al. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research Journal**, v. 3, p. 134–147, 2004.
- FLAUGNATTI, N.; LE, T. T.; CANAAN, S.; ASCHTGEN, M. S.; NGUYEN, V. S.; BLANGY, S. A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. **Molecular Microbiology**, v. 99, p. 1099–1118, 2016.
- GALAN, J. E.; WAKSMAN, G. Protein-injection machines in bacteria. **Cell** v. 172, p. 1306–1318, 2018.
- GARCÍA-BAYONA, L.; COMSTOCK, L. E. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. **Science**, v. 361, n. 6408, p. eaat2456, 2018.
- GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 10, p. 833–845, 2016.
- GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, n. 8, p. 913–926, 1992.
- GREEN E. R.; MECSAS J. Bacterial secretion systems: An overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.
- HACHANI, A. et al. The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17872–17884, 2014.
- HACHANI, A. et al. Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: Secretion and multimerization of VgrG proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 14, p. 12317–12327, 2011.
- HACHANI, A.; WOOD, T. E.; FILLOUX, A. Type VI secretion and anti-host effectors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 29, p. 81–93, 2016.

- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.
- HO, B. T.; DONG, T. G.; MEKALANOS, J. J. A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 1, p. 9–21, 2014.
- HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; GUIMARÃES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A. G.; VASCONCELOS, A. T. R. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 102–116, 2004.
- KAPITEIN, N., MOGK, A. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 52–58, 2013.
- LEIMAN, P. G. et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4154–4159, 2009.
- LIANG, X.; MOORE, R.; WILTON, M.; WONG, M. J.; LAM, L.; DONG, T. G. Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 9106–9111, 2015.
- LIEN, Y.-W.; LAI, E.-M. Type VI secretion effectors: Methodologies and biology. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 254, 2017.
- MA, L. S.; HACHANI, A.; LIN, J. S.; et al. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of Type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. **Cell Host and Microbe**, v. 16, p. 94–104, 2014.
- MACINTYRE, D. L. et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 45, p. 19520–19524, 2010.
- MALTEZ, V. I. et al. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 987–997, 2015.
- MARTINEZ, R.; VELLUDO, M. A.; SANTOS, V. R.; DINAMARCO, P. V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 111–3, 2000.
- MIKI, T. et al. The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1186–1203, 2011.
- MIKI, T.; IGUCHI, M.; AKIBA, K.; et al. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 855–872, 2010.

- MOUGOUS, J.D. et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, v. 312, p. 1526-1530, 2006.
- MURDOCH, S. L. et al. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 21, p. 6057–6069, 2011.
- PAN, J. et al. Integration host factor modulates the expression and function of T6SS2 in *Vibrio fluvialis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–13, 2018.
- PISSARIDOU, P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 49, p. 12519-12524, 2018.
- PUKATZKI, S. et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 1528–1533, 2006.
- PUKATZKI, S.; MA, A. T.; REVEL, A. T.; et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 15508-15513, 2007.
- RAFFATELLU, M. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1097–1103, 2018.
- RAMIREZ, J. L. et al. *Chromobacterium* Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.
- RAY, A.; SCHWARTZ, N.; DE SOUZA SANTOS, M.; et al. Type VI secretion system MIX effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. **EMBO Reports**, v. 18, p. 1978-1990, 2017.
- RENAULT, M. G. et al. The gp27-like Hub of VgrG serves as adaptor to promote Hcp tube assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 18, p. 3143–3156, 2018.
- ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDANI, R. L.; GOMES, S. L.; SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.
- RUSSELL, A. B.; LEROUX, M.; HATHAZI, K.; et al. Diverse Type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. **Nature**, v. 496, p. 508-512, 2013.
- RUSSELL, A. B.; SINGH, P.; BRITTNACHER, M.; et al. A widespread bacterial Type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. **Cell Host and Microbe**, v. 11, p. 538-549, 2012.

- SANA, T. G. et al. *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 34, p. E5044–E5051, 2016.
- SANA, T. G. et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and *fur* and modulates internalization in epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 32, p. 27095–27105, 2012.
- SANTOS, M. N. M. et al. Redundancy and specificity of Type VI secretion *vgrG* loci in antibacterial activity of *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609 strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–15, 2020.
- SCHWARZ, S.; WEST, T. E.; BOYER, F.; et al. *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 77–78, 2010.
- SHA, J. et al. Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 6, p. 1120–1135, 2013.
- SHALOM, G.; SHAW, J. G.; THOMAS, M. S. In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 8, p. 2689–2699, 2007.
- SHNEIDER, M. M.; BUTH, S. A.; HO, B. T.; BASLER, M.; MEKALANOS, J. J.; LEIMAN, P. G. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. **Nature**, v. 500, p. 350–353, 2013.
- SILVA-ROCHA, R. et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 666–675, 2013.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.
- SIQUEIRA, I. C.; DIAS, J.; RUF, H. *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1443–1445, 2005.
- SNEATH, P. H. A.; WHELAN, J. P. F.; SINGH, R. B.; EDWARDS, D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*, **The Lancet**, v. 265, p. 276–277, 1953.
- SOUZA, D. P. et al. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature communications**, v. 6, p. 6453, 2015.
- STAUFF, D. L.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 15, p. 3871–3878, 2011.

- STUBBENDIECK, R. M.; STRAIGHT, P. D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 16, p. 2145–2155, 2016.
- UNNIKRISHNAN, M. et al. The enigmatic Esx proteins: Looking beyond Mycobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 192–204, 2017.
- UNTERWEGER, D.; KOSTIUK, B.; OTJENGERDES, R.; WILTON, A.; DIAZ-SATIZABAL, L.; PUKATZKI, S. Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. **EMBO Journal**, v. 34, p. 2198–2210, 2015.
- VASCONCELOS A. T. R.; ALMEIDA D. F.; HUNGRIA M., 106 other authors. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, p. 11660–11665, 2003.
- WALLDEN, K.; RIVERA-CALZADA, A.; WAKSMAN G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 1203–1212, 2010.
- WHITNEY, J. C. et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 529–542, 2014.
- WOOD, T. E. et al. PAAR proteins act as the ‘sorting hat’ of the type VI secretion system. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 11, p. 1208–1218, 2019.
- YANG, C. H.; LI, Y. H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435–441, 2011.
- ZHANG, W. et al. Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by AHL-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 5, p. 351–363, 2011.
- ZHENG, J.; LEUNG, K.Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. **Molecular Microbiology**, v. 66, p. 1192–1206, 2007.
- ZONG, B. et al. Characterization of multiple type-VI secretion system (T6SS) VgrG proteins in the pathogenicity and antibacterial activity of porcine extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 118–132, 2019.
- ZOUED, A.; BRUNET, Y. R.; DURAND, E.; et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1664–1673, 2014.